

Aus der Klinik für Innere Medizin I
Klinik für Hämatologie, Onkologie und Rheumatologie
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Prof. Dr. med. Christoph Renner

Serologische Identifikation von Pankreaskarzinom-spezifischen Antigenen

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2010

vorgelegt von Sebastian Kobold
geboren am 26. August 1983 in Würzburg

Meiner Großmutter gewidmet, viel zu früh von uns gegangen...

„Nous rêvons une vie et en vivons une autre“

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	14
1.1. Das Pankreaskarzinom	14
1.2. Einteilungen des Pankreaskarzinomes	14
1.3. Symptomatik und Diagnostik.....	17
1.4. Therapie des Pankreaskarzinomes	17
1.5. Strategien der Immuntherapien	18
1.6. Das RAYS Verfahren:.....	20
1.7. Ziele und Wege dieser Arbeit.....	21
2. Material	22
2.1. Chemikalien	22
2.2. Antikörper	23
2.3. Puffer.....	24
2.4. Lösungen	26
2.5. Gele	28
2.6. Zellstämme	29
2.7. Nährmedien	30
2.9. Oligonukleotide.....	34
2.10. Patientenproben	36
2.10. Kits	38
2.11. Geräte	39
2.12. Computersoftware	40
3. Methoden.....	41
3.1. Bakterien-Techniken	41
3.2. Hefe-Techniken	42
3.3. DNA-Techniken	43
3.3.1. Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien	43
3.3.2. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	43
3.3.3. Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	43
3.3.4. Ligation von DNA-Fragmenten	43
3.3.5. Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen.....	44

Inhaltsverzeichnis

3.3.6. Agarosegelelektrophorese	44
3.3.7. Sequenzierung von DNA-Fragmenten	44
3.3.8. Herstellung eines DNA- Sequenzgels	45
3.4. RNA-Techniken	46
3.5. Protein-Techniken	47
3.6. Immunfluoreszenz-Techniken.....	49
3.7. Methoden der Phage display Technologie	51
3.7.1. Beschreibung der Fab Library.....	51
3.7.2. Infektion von TG1 E.coli durch infektiöse Phagen.....	51
3.7.3. Ermittlung des Phagentiters	52
3.7.4. Selektion spezifischer Antikörper gegen bestimmte Peptide	53
3.7.5. Testung der Spezifität der selektierten Binder	54
3.7.6. Produktion löslicher Fabs	54
3.7.7. Aufreinigung löslicher Fabs	54
3.7.8. Evaluierung der Diversität selektionierter Klone durch PCR-Amplifikation und DNA-Fingerprinting.....	55
3.7.9. Quantifizierung der Fab-Antikörper.....	55
3.7.10. Immunzytometrische Färbungen.....	55
3.8. Methoden der Zellkultur.....	56
3.9. Immunhistochemische Methoden	58
3.10. Epitop-Vorhersage	59
4. Ergebnisse	60
4.1. Herstellung einer cDNA Library.....	60
4.2. Screening nach cDNA-Hefeklonen mit immunogenem Potential	63
4.3. Charakterisierung der selektierten cDNA Klone	67
4.4. Induktion der Hefeklone.....	71
4.5. Translationsnachweis der Inserts	73
4.6. Serologische Aufarbeitung.....	74
4.7. Statistische Bearbeitung	82
4.8. Epitop-Vorhersagen	83
4.9. Isolation von spezifischen Fab-Antikörper für die selektionierten und charakterisierten Pankreas-cDNA-Hefe-Peptiden	84

Inhaltsverzeichnis

4.10. Bindungsaffinität der Fab-Antikörper zu den Hefeoberflächenproteinen.....	93
4.11. Versuche zur Detektion der untersuchten Peptide	96
5. Diskussion	102
5.1. Analyse der Methodik	103
5.2. Bewertung der identifizierten Antigene	106
5.3. Ausblicke.....	111
Literaturverzeichnis.....	112
Danksagung.....	133
Vorabveröffentlichungen	134
Lebenslauf	135

Abkürzungen:

AG	Ampicillin und 2% Glukose Zusatz
Aga1p	a-Agglutinin-Rezeptor, Untereinheit 1
Aga2p	a-Agglutinin-Rezeptor, Untereinheit 2
AK	Ampicillin, Kanamycin und 2% Glukose Zusatz
AMAB	Anti Mycotic, Anti Biotic
APS	Ammoniumpersulfat
ARS	autonom replizierende Sequenz
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninic acid
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaar
BSA	bovine serum albumin
C/T-Antigene	Cancer/Testis-Antigene
CAA	Casamino acids (Medium)
CaCl ₂	Calciumchlorid
cDNA	complementary-DNA
CDS	codierender Sequenzbereich eines Gens
CFU	Colony Forming Unit
cm	Centimeter
CMRL	Cisco Memorial Research Laboratory
c-myc	Genprodukt des myc Onkogens
CT	Computertomographie
DEPC	Diethyl-Pyrocarbonat
dest.	destilliert
DH5a	verwendeter Stamm des Bakteriums <i>Escherischia coli</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
(d)dNTP	(Di)desoxynukleotidtriphosphat
dsDNA	Doppelstrang DNA
DTT	Dithiotreitol

Abkürzungen

E. coli	Echerischia coli
EBY100	verwendeter Stamm der Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzym Linked Immunosorbent Assay
et al.	et alii
ExPasy	Expert Protein Analysis
Fab	Antigen Binding Fragment
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fetales Kälberserum
Fcγ	Fragment crystallizable gamma
FL	Fluoreszenz
FSC	Forward-Scatter
g	Gramm
Gal	Galaktose
GITC	Guanidinium-Thioisocyanat
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)- Ethansulfonsäure
His	Histidin
HNPCC	Hereditäre non polyposis coli
HRP	Horse-Raddish-Peroxidase
Hsp	Heat shock protein
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl – β – D – thiogalactopyranoside
K	Kalium
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid

Abkürzungen

kDa	Kilodalton
L	Liter
LB	Luria-Bertani
LM	Längenmarker
m	männlich
M	Molar
mA	Milliamper
MaCa	Mammakarzinom
MD	Minimal Dextrose (Medium)
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMP11	Matrix-Metalloproteinase 11
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
MPBS	Magermilch/PBS Lösung
mRNA	Boten (messenger)-RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
MSI	Microsatelliten Instabilität
N	Normal
n.B.	Nicht beurteilbar
N-EAA	Non- Essential-Amino-Acids
Na	Natrium
NaAc	Natrium-Acetat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OD	optische Dichte
ORF	Open Reading Frame

Abkürzungen

p.A.	Pro Analysi
PankreasCa	Pankreaskarzinom
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	R-Phycoerythrin (Farbstoff)
PET-CT	Positronen Emisionstomographie
pfu	Plaque forming Units
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H_3O^+ -Ionenkonzentration
pN+	nodal positiv
pN-	nodal negativ
Pox	Peroxidase
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
rpm	Rounds Per Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT-PCR	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
	Serological Analysis of Tumor Antigens by Recombinant cDNA Expression
SEREX	Cloning
SOC	Super Optimal Broth mit Katabolirepression
SSC	Sideward-Scatter
SYFPEITHI	Datenbank für MHC Epitope
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tag	Anhängsel
TBE	Tris-Borsäure-Acetat
TENS	Tris-EDTA-NaOH-SDS
TG1	E. coli Stamm
TNM	Tumor-Node-Metastasis
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer-RNA

Abkürzungen

TS	Tris-Sucrose Puffer
TY	Tryptone-Yeast Extract Medium
U	Unit
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
UV	Ultraviolett
V	Volt
VH	Heavy Chain
VL	Light Chain
v/v	Volumenprozent
w	Weiblich
WB	Western Blot
w/v	Gewichtsprozent
YNB	Yeast Nitrogene Base
YPD	Yeast Peptone Dextrose
°C	Grad Celcius
Λ	Lambda, Wellenlänge
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
%	Prozent
#	Summe
x	Mal

Zusammenfassung:

Das Pankreaskarzinom hat mit seiner Chemotherapieresistenz und einer 100%igen Mortalität eine infauste Prognose. Um diese zu verbessern, müssen neue therapeutische Wege beschritten werden. Die Immuntherapie stellt sich als viel versprechendes, noch nicht ausgeschöpftes Therapeutikum dar. Hierfür müssen neue antigene Strukturen definiert werden. Das Ziel dieser Arbeit ist die Identifikation und der Nachweis neuer Pankreaskarzinom-spezifischer Antigene. Eine komplexe cDNA Bank wurde aus Pankreaskarzinomgewebe generiert und in einem Hefvektor rekombinant kloniert. Autoreaktive Klone konnten mittels Patientenseren isoliert und anschließend charakterisiert werden. 10 potentiell interessante Klone wurden anhand von Literaturrecherchen und Vordaten zur serologischen Reihenuntersuchung bestimmt. 99 Pankreaskarzinompatientenseren, 63 Seren gesunder Spender und 14 Seren von Pankreatitispatienten wurden immunzytochemisch auf Antikörper gegen diese Klone untersucht. Der Nachweis auf Proteinebene des reaktivsten Klons (Reaktivitäten in der Tumorerengruppe von 29,9%) wurde durch die Selektion von spezifischen Fab-Antikörpern aus einer Fab-Phage Display Library angestrebt. Gegen diese hier identifizierte Antigenstruktur konnten zwei spezifische Fab-Antikörper isoliert werden, die zur Färbung humaner Tumorzelllinien genutzt wurden. Die Zelllinien ließen sich im FACS und im Gewebe-array mit einigen dieser Antikörper anfärben, was einen sehr starken Hinweis auf die Existenz und Expression dieses Antigens lieferte. So war es in dieser Arbeit möglich immunogen wirkende Translationsprodukte aus Pankreaskarzinomgewebe zu isolieren und Fab-Antikörper mit Spezifität für einen dieser Antigene zu selektionieren und produzieren. Damit könnte der in dieser Arbeit aufgezeichnete Weg ein erster Schritt in der Etablierung einer effektiven Immuntherapie zur Behandlung von fortgeschrittenen Pankreaskarzinomen sein.

Abstract:

„Serological identification of pancreatic cancer specific antigens”

Pancreatic cancer is well known for its resistance to conventional chemotherapy, as well as for its poor prognosis. To increase survival, new therapeutic approaches need to be established with Immunotherapy representing an important option. For that purpose, new antigens need to be identified. The main goal of this work is the identification and detection of pancreatic cancer specific antigens. A cDNA library was generated from pancreatic cancer tissues and recombinantly cloned in a yeast vector system. High speed cell sorting allowed the selection of autoreactive clones when stained with patients' sera. According to literature and to former results of our group, 10 clones were selected for further analysis. A pool of sera from 99 pancreatic cancer patients, 63 healthy donors and 14 pancreatitis patients was screened by flow cytometry for the presence of antibodies specific for these clones. The proof of the existence on protein level of the most reactive clone (29, 9% reactivity in tumor sera) was done by screening a Fab-Phage Display library for specific antibodies. Two specific antibodies were selected against this target antigen and used to stain human tumor cell lines. Several tumor cell lines were recognised by the selected antibodies. This staining suggests strongly the existence and the expression of the target antigene *in vivo*. As part of the present thesis, we have been able to identify cDNAs which code for antigens with increased immunogenicity. For one antigen, specific Fab antibodies could be selected and used for staining human cell lines. The way taken by this thesis might be a first step in the establishment of new immunotherapy for advanced stage of pancreatic cancer.

Einleitung

Die Gegenüberstellung der Epidemiologie und der Klinik des Pankreaskarzinoms mit dessen Therapie und Prognose weist unzureichende therapeutische Erfolge auf. Durch seine genetischen und immunologischen Besonderheiten ist das Pankreaskarzinom für Immuntherapien interessant. Mit der RAYS-Labor-Methode sollten neue tumorspezifische Antigene identifiziert werden.

1.1. Das Pankreaskarzinom

Definition und Epidemiologie: Ein Karzinom ist eine maligne Transformation eines Gewebes epithelialen Ursprungs. Dementsprechend ist das Pankreaskarzinom der Oberbegriff für maligne Entartungen des Bauchspeicheldrüsengewebes (Pankreas). Die Inzidenz beträgt in Deutschland etwa 13,5/100000 Einwohner, die Geschlechterverteilung liegt bei 8,1/5,4 (Verhältnis m/w) (Heinemann et al., 2001). Die Inzidenz steigt mit zunehmendem Alter und findet ihren Erkrankungsgipfel zwischen der 7. und 8. Lebensdekade (Heinemann et al., 2001). Das mittlere Überleben nach Erstdiagnose beträgt 5-8 Monate, die Fünf-Jahres Überlebensrate liegt bei 2%, mit einer Gesamtletalität der Erkrankung von nahezu 100% (Schoppmeyer et al., 2004). Das Pankreaskarzinom ist somit in Europa die sechsthäufigste Todesursache durch Tumore, in den Vereinigten Staaten sogar die vierthäufigste (Michaud et al., 2004).

1.2. Einteilungen des Pankreaskarzinomes

Einteilung nach histologischen Charakteristika: Die WHO veröffentlichte 1996 die aktuell gültige histologische Einteilung der Pankreaskarzinome (Tabelle 1). In dieser Arbeit wurde der häufigste histologische Befund untersucht: das duktales Adenokarzinom. Dieses wird in der vorliegenden Arbeit als Synonym für das Pankreaskarzinom verwendet.

Tabelle 1: Histologische Übersichtseinteilung maligner Pankreastumore nach WHO

(In Klammern relative Häufigkeiten)

<p>Borderline</p> <p>unsichere maligne Potenz</p>	<p>Muzinöser zystischer Tumor mit mäßiger Dysplasie</p> <p>Intraduktales papillär-muzinöser Tumor mit mäßiger Dysplasie</p> <p>Solid-pseudopapillärer Tumor</p>
<p>Maligne</p>	<p>Schwere duktales Dysplasie/Carcinoma in situ</p> <p>Duktales Adenokarzinom (80 - 85 %)</p> <p>Muzinöses nicht zystisches Karzinom (1 - 3 %)</p> <p>Siegelringzellkarzinom (1 %)</p> <p>Adenosquamöses Karzinom (3 - 4 %)</p> <p>Undifferenziertes anaplastisches Karzinom (2 - 7 %)</p> <p>Gemischtes duktales-endokrines Karzinom (< 1 %)</p> <p>Osteoklasten-artiger Riesenzelltumor (< 1 %)</p> <p>Seröses Zystadenokarzinom</p> <p>Muzinöses Zystadenokarzinom</p> <p>Intraduktales papillär- muzinöses Karzinom</p> <p>Azinuszellkarzinom (1 %)</p> <p>Azinuszell- Zystadenokarzinom</p> <p>Gemischt azinär-endokrines Karzinom</p> <p>Pankreatoblastom</p> <p>Solid-pseudopapilläres Karzinom</p> <p>Verschiedene Karzinome</p>

Einteilung nach pathoanatomischen Kriterien: Die UICC veröffentlichte 2003 die zur Zeit aktuelle Klassifikation des Pankreaskarzinoms entsprechend des pathoanatomischen Befundes. Diese als TNM (T=Tumor, N=Node, M=Metastasis) bezeichnete Klassifikation gibt Hinweise über die Operabilität, die möglichen Behandlungsalternativen und die zu erwartende Prognose.

Tabelle 2a: Übersicht der T-Einteilung des Pankreaskarzinoms nach UICC 2003

Primärtumor	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor beschränkt auf das Pankreas, 2 cm oder weniger im größten Durchmesser
T2	Tumor beschränkt auf das Pankreas, größer als 2 cm im größten Durchmesser
T3	Tumor erstreckt sich direkt in Duodenum, Ductus choledochus oder peripankreatisches Gewebe
T4	Tumor erstreckt sich direkt in Magen, Milz, Kolon oder benachbarte große Gefäße

Tabelle 2b: Übersicht der N-Einteilung des Pankreaskarzinoms nach UICC 2003

N	Regionäre Lymphknoten
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknoten-Metastasen
N1	Regionäre Lymphknoten Metastasen
	N1a : Metastase in einem einzelnen Lymphknoten
	N1b : Metastasen in multiplen regionären Lymphknoten

Tabelle 2c: Übersicht der M-Einteilung des Pankreaskarzinoms nach UICC 2003

M	Metastasen
MX	Fernmetastasen nicht beurteilbar
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastase(n)

Die Zusätze vor dem „TNM“, verweisen auf die Methode(n), die zur Erhebung dieses Befundes angewandt wurde(n) (p: Pathologie, c: Bildgebung,...). Die TNM Klassifikation ist per Definition eher eine chirurgische Einteilung. Eine onkologisch-medizinische Einteilung ist die Klassifikation der Befunde nach Stadien. Diese Einteilung wird auch für die Bestimmung von Therapien und Prognosen genutzt (Tabelle 2d).

Tabelle 2d: Übersicht über die Stadieneinteilung des Pankreaskarzinoms nach UICC 2003

Stadieneinteilung			
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium II A	T2	N0	M0
Stadium II B	T3	N0	M0
Stadium III	T1-3	N1	M0
Stadium IV	Jedes T	jedes N	M1

1.3. Symptomatik und Diagnostik

Die klinische Symptomatik des Pankreaskarzinoms ist unspezifisch und tritt in der natürlichen Geschichte des Tumors spät auf (Schlag et al., 2002). Die meisten Patienten leiden im Verlauf an einem Verschlussikterus, starken Gewichtsverlusten und starken Schmerzen (Schoppmeyer et al., 2005 und Wigmore et al., 1997). Bei Verdacht auf diese Erkrankung kann eine Reihe bildgebender Verfahren genutzt werden (z.B.: Ultraschall, CT, MRT, PET-CT). Diagnostisch beweisend ist die Biopsie, als Verfahren mit der höchsten Spezifität, jedoch mit einer geringen Sensitivität (Schlag et al., 2002). Die bildgebende Diagnostik ist entscheidend für die Wahl des Therapieverfahrens.

1.4. Therapie des Pankreaskarzinomes

Der kurative Ansatz: Grundsätzlich ist der einzige kurative Ansatz die Operation. Bei Diagnosestellung sind nur 10-20% der Pankreaskarzinome resektabel (Schoppmeyer et al., 2004). Als operabel gelten nicht metastasierte Tumore, die die Arteria mesenterica superior nicht infiltrieren. Der endgültige Entscheid über die Resektabilität ist oft erst intraoperativ möglich. Das Verfahren der Wahl ist die Operation nach Kausch-Wipple (eine pancreatico-duodenale Resektion, Cameron et al., 2006). Ein Tumor zu gesundem Gewebe Abstand von 2 cm sollte erreicht werden. Gleichzeitig werden die regionalen Lymphknoten ausgeräumt. Die Tumorfreiheit der Resektionsränder ist für die Prognose entscheidend. Nahezu alle dukталen Adenokarzinome des Pankreaskopfes rezidivieren lokal oder in Form von Fernmetastasen (nach Leitlinien des Tumorzentrum Berlin, 2002). Der Nutzen einer prä- oder postoperativen Radio-

und/oder Chemotherapie ist umstritten, und wird aktuell in klinischen Studien untersucht (Mayer et al., 2002).

Der palliative Ansatz: Im Vordergrund stehen symptomatische Maßnahmen (Stenting, Antiemese, Schmerztherapie, parenterale Ernährung, Entlastungsmöglichkeiten). Der Stellenwert der Chemotherapie ist abhängig von der Symptomatik. Bei therapienaiven Patienten kann ein Behandlungserfolg erhofft werden. Dennoch sollte die Chemotherapie stets der symptomatischen Therapie den Vortritt lassen (Ausnahme: die Chemotherapie ist als symptomatische Therapie vorgesehen). Während 5-Fluorouracil lange Zeit als Standardtherapeutikum galt, ist nun Gemcitabine das Mittel der Wahl (Burris et al., 1997). Bei ähnlicher Wirksamkeit hat Gemcitabine eine bessere Verträglichkeit (nach Leitlinien des Tumorzentrums Berlin, 2002). Aktuell werden Kombinationen von Gemcitabine mit anderen Substanzen hinsichtlich besserer Wirksamkeit untersucht. Bislang zeigten diese Studien, wie z.B. bei Gemcitabine und Oxaliplatin, eine verbesserte Ansprechrate, aber keine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit (Louvret et al., 2004). Die Radiochemotherapie kommt zum Einsatz bei lokal fortgeschrittenen, nicht metastasierten Tumoren, sowie bei osteolytischen Metastasen. Die Kombinationen mit Gemcitabine oder 5-Fluorouracil, als Radiosensitizer, zeigte eine Verlängerung der Überlebenszeit (Moertel et al., 1981). Weitere klinisch-therapeutische Untersuchungen wenden sich zunehmend immuntherapeutischen Ansätzen zu. Verschiedene Antikörpertherapien sowie Vakzinetherapien sind zur Zeit Gegenstand klinischer Studien (Saif et al., 2007). Einige solcher klinischer Phase I-II Studien konnten Erfolge als Adjuvans zu Gemcitabine verzeichnen (Wobser et al., 2006 und Yanagimoto et al., 2007). Die prekäre Wirkung der „Standard“-Chemotherapeutika, sowie die infauste Prognose des Pankreaskarzinoms machen alternative Behandlungsstrategien erforderlich. Ein möglicher Ansatzpunkt wäre die Immuntherapie, als nicht ausgeschöpfter und Therapiezweig. Da die Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Renner sich mit der Suche nach neuen Antigenen zu diesem Zwecke befasst, soll dieser Ansatz in dieser Arbeit befolgt werden.

1.5. Strategien der Immuntherapien

Immuntherapien benötigen Zielstrukturen mit möglichst einzigartiger Expression. Diese werden durch das Therapiekonzept gezielt angesteuert (Vakzinierung, Antikörpertherapie, usw.). Am

Beginn eines jeden immuntherapeutischen Ansatzes steht somit die Identifikation eines oder mehrerer Antigene mit hoher Spezifität und Sensitivität.

Neoantigene in Malignomen: Malignome sind „genetische“ Erkrankungen, somit Erkrankungen des Genoms. Im Kolonkarzinommodell werden 5-10 Mutationen benötigt um einen malignen Phänotyp auszubilden (Nowell et al., 1976 und Vogelstein et al., 1993). Weiterhin sind zahlreiche Tumore charakterisiert durch Defekte im DNA-Reparatursystem, auch als Instabilitäten der Mikrosatelliten bezeichnet. Solche Tumore zeichnen sich sinngemäß durch eine besonders hohe Anzahl an Mutationen aus. Außerdem haben entartete Zellen ihr natürliches Hayflick-Limit verloren (maximal mögliche Teilungszahl pro Zelle). Somit steigt theoretisch die Wahrscheinlichkeit neu auftretender Mutationen in diesen Zellen mit jeder weiteren Teilung. Im Kolon- und Brustkarzinommodell finden sich im Durchschnitt 11 mutierte Gene, mit entsprechend mutierter Expression, pro maligne Zelle (Vogelstein et al., 2006). Auch wenn nicht jedes dieser mutierten Gene zu einem veränderten Expressionsprodukt führt, so ist dies, auf die Gesamtzahl der Zellen eines Tumors potenziert, eine erhebliche Zahl an potentiellen neuen, bzw. veränderten Proteinen. Analog lässt sich dieses Erkenntnis wahrscheinlich auf einen Großteil anderer Malignome übertragen.

Dies würde sich gut mit den Ergebnissen der SEREX-Methodik (siehe 1.6.) decken. Dieser weit verbreitete Ansatz zur Erfassung von Neoantigenen brachte stets zahlreiche Antigene zum Vorschein. Eine der großen Errungenschaften dieser Methodik war die Identifikation der Cancer Testis Antigene (Sahin et al., 1995). Die C/T-Antigene stehen für eine Gruppe, welche nur im Testis und in humanem Karzinomgewebe exprimiert wird. Diese Gattung ist inzwischen vielfach in den verschiedensten Malignomen nachgewiesen worden und wird in zahlreichen klinischen Studien untersucht (Old et al., 2002). Die SEREX-Methodik weist durch die ständig wachsende Zahl an identifizierten Antigenen auf das große Potential des Proteoms hin.

Neoantigene und Pankreaskarzinom: Das Pankreaskarzinom ist ein Malignom mit hoher Mutationsrate (Hilgers et al., 1999). Auch wenn nur ein geringer Teil durch genetische Prädispositionen bedingt (5-10%) oder mit hereditären Syndromen (Peutz-Jeghers-Syndrom, HNPCC) assoziiert ist (Rieder et al., 2002), weisen nahezu alle Pankreaskarzinome Mutationen von Protoonkogenen, bzw. Tumorsuppressorgenen (p53, BRCA2, DCP4, K-RAS) auf. Zum

Beispiel konnten, je nach Studie, in bis zu 100% der Proben Mutationen im K-RAS Gen nachgewiesen werden (Hahn et al., 1997). Dies weist auf die Expression von mutierten Genprodukten hin (z.B. von p53). Verschiedenste C/T Antigene sind bereits in diesem Zusammenhang untersucht worden (RT-PCR, B-Zell Antworten, Immunhistochemie; Wadle et al., 2006 und Kubuschok et al., 2004). Weiterhin finden im Pankreaskarzinom Autoimmunvorgänge im Sinne der Bildung von Antikörpern gegen exprimierte Proteine statt (Bingley et al., 2005). Zum Beispiel besitzen etwa 15% aller Patienten Antikörper gegen p53. Die Kombination aus der Überexpression der CT Antigene und der Bildung von Autoantikörpern macht das Pankreaskarzinom besonders interessant für immunologische Untersuchungen. Die SEREX-Methode könnte unter Berücksichtigung dieser Erkenntnis helfen, neue immunogene Antigene zu identifizieren und diese als Zielstrukturen für Immuntherapien zu nutzen.

1.6. Das RAYS Verfahren:

Das Prinzip des RAYS: Recombinant Antigens expressed on Yeast Surface (Wadle und Mischo, 2003) dient analog zum SEREX (Sahin et al., 1995) der Identifikation von Antigenen.

Im weitesten Sinne ist das RAYS die Suche nach autoreaktiven Antikörpern, sowie der dadurch identifizierten Proteine. Zunächst wird aus frischen Tumorproben eine cDNA-Bank erstellt, diese wird dann in Zellen (*Saccharomyces cerevisiae*) transformiert. Das Prinzip ist der Einbau von zu mRNA komplementärer DNA in ein Vektorsystem, das transformiert in einer Zelle, im entsprechenden Medium, die Oberflächenexpression ermöglicht. Die so exprimierten Proteine können direkt auf der Oberfläche analysiert werden (Dies ist eines der wesentlichen Unterschiede zum SEREX, Chen et al., 1997, Türeci et al., 1998). Nach Inkubation mit Patientenseren, werden diese mit Anti-humanen IgG behandelt um Bindungen von Patienten IgG an den Proteinen nachzuweisen. Die reaktiven Antigene werden anschließend durch Sequenzierung identifiziert (unter 4.1.).

In vivo werden geschätzte 50-90% aller Proteine posttranslational modifiziert, und erlauben auf diese Weise den Peptiden, neue Konformationen anzunehmen. Daraus kann resultieren, dass ein Protein als fremd erkannt wird oder nicht (Doyle et al., 2001).

Aus diesen Punkten werden Nachteile des klassischen SEREX-Verfahrens deutlich, wie das Ausbleiben der posttranslationalen Modifikation (Glykosilierung, Oxidation, Phosphorylierung), welche in Bakterien nicht oder nur sehr primitiv abläuft. Um diese Einschränkungen zu

reduzieren, wurde das SEREX auf Eukaryonten (Hefen) übertragen, da der posttranslationale Apparat des Menschen dem der Hefen sehr ähnlich ist (Boder und Wittrup, 1997). So konnten beispielsweise Antikörper gegen einige C/T Antigene in Pankreaskarzinompatientenseren nachgewiesen werden. Gleichzeitig konnte eine Expressionsanalyse eine Überexpression einiger Antigene hervorbringen (Wadle et al., 2006). Diese Überexpression wurde durch andere Arbeitsgruppen bestätigt (Schmitz-Winnenthal et al., 2007). In Anbetracht der wesentlich größeren Menge an erfassbaren Antigenen birgt das RAYS großes Potential hinsichtlich der Identifikation von immunogenen Tumorantigenen.

1.7. Ziele und Wege dieser Arbeit

Das primäre Ziel dieser Arbeit ist die Identifikation neuer tumorspezifischer Zielstrukturen (Neoantigene) aus einer Pankreaskarzinom-cDNA Bank. Diese Antigene sollen in serologischen Reihenuntersuchungen auf immunogene Patienten-Autoreaktivität untersucht werden. Weiterhin sollen die potentesten Antigene in Pankreaskarzinomzelllinien mit Antikörper-basierten Methoden nachgewiesen werden.

2. Material

2.1. Chemikalien

Antibiotika:	Ampicillin (Binotal, Grünenthal, Deutschland) Ciproxin (Bayer, Wuppertal, Deutschland) Kanamycin (Baack Laborbedarf, Deutschland) Antibiotic/Antimicotic solution (Millipore, Schwalbach, Germany)
Beads:	Dynabeads M280 Streptavidin (Invitrogen, Carlsbad, USA) TALON™ resin (CLON-TECH , LaJola, USA))
Chemikalien (Reinheitsgrad p.A.):	Merck (Darmstadt, Deutschland) Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) Roth (Karlsruhe, Deutschland) Fischar (Saarbrücken, Deutschland)
Dialyseschläuche:	Snake-skin-Dialysemembran (Pierce, Rockford, USA)
ELISA-Reagenz:	TMB-peroxydase kit (Kirkegaard & Perry Lab., Gaithersburg, USA)
Enzyme:	Restriktionsendonukleasen (Fermentas, St Leonrod, Deutschland) T4-Ligase (Roche, Mannheim,

Material

	Deutschland)
	Polymerase (Stratagene, LaJolla, USA),
	Taq-Polymerase (Qiagen, Hilden,
	Deutschland),
	Proofstart DNA Polymerase (Qiagen)
Fotochemikalien:	Röntgenfilm (Fuji™ Medical X-Ray Films 03E260, Düsseldorf, Deutschland)
	ECL-Western™ Blotting Detection Reagents (Amersham, Braunschweig, Deutschland)
Membranen:	Immobilion (Millipore, Bedford, USA)
Zellkulturmedien und Chemikalien:	GIBCO™ (Invitrogen), Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)

2.2. Antikörper

- Biotin-SP-conjugated AffinityPure Mouse Anti-Human IgG Fcγ Fragment specific,
(Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA) 1:200 (If)
- Biotin-SP-conjugated AffinityPure Goat Anti-Human IgG F(ab)2 Fragment specific,
(Jackson Immuno Research) 1:200 (If)
- Biotin-SP-conjugated AffinityPure Goat Anti-Mouse IgG F(ab)2 Fragment specific,
(Jackson Immuno Research) 1:200 (If)
- AffinityPure Goat Anti-Human IgG F(ab)2 Fragment specific, HRP conjugated,
(Jackson Immuno Research) 1:15000 (ELISA)
- AffinityPure Mouse Anti-Human IgG Fcγ Fragment specific, HRP conjugated,
(Sigma Aldrich) 1:10000 (ELISA)
- AffinityPure Goat Anti-Mouse IgG F(ab)2 Fragment specific, HRP conjugated
(Jackson, Immuno Research) 1:2000 (ELISA)
- AffinityPure Mouse Anti-M13 1:200 (If)
(Amersham-Pharmacia, Wien, Österreich) 1:2000 (ELISA)
- Monoclonal anti c-myc produced in Mouse (Sigma Aldrich) 1:200 (If)
- Biotin-SP-conjugated Monoclonal anti c-myc produced in Mouse (Sigma Aldrich)
1:200 (If)
- Sekundäres Immunfluoreszenz-Färbesystem:
R-Phycoerythrin-conjugated Streptavidin, (Jackson Immuno Research)
1:200 (If)
- anti-penta-His, (Qiagen) 1:50 (If)
1:3000 (WB)
- anti-Xpress™, (Invitrogen) 1:200(If)
1:5000 (WB)
- Streptavidin-conjugated Horse-Raddish-Peroxidase (Bio-Rad, München, Deutschland)
1:150000 (WB)

Material

2.3. Puffer

Ligasepuffer(10x):	500 µg/ml bovine serum albumin 100 mM MgCl ₂ 100 mM DTT 500 mM Tris/HCl (pH=7,5)
PBS (phosphate-buffered saline):	130 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,7 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
PCR-Puffer:	50 mM KCl 10 mM Tris/HCl , pH 8,3 1,5 mM MgCl ₂ 1 mg/ml Gelatine
Reaktionspuffer (10x) für die Taq-DNA-Polymerase :	500 mM KCl 15 mM MgCl ₂ 100 mM Tris/HCl,pH=9,0
TAE-Puffer (50x):	2 M Tris-HCl 1 M NaAc 0,05 M EDTA mit Eisessig ad pH=7,8
TBE-Puffer (10x):	0,89 M Tri-HCl (pH=8,3 +/- 0,2) 0,89 M Borsäure 0,2 M EDTA
TENS-Puffer:	10 mM Tris, pH=8 1 mM EDTA

Material

	0,1 M NaOH
	0,5% (w/v) SDS
Ladepuffer für DNA- Agarosegelelektrophorese (10x):	10 Teile 10x TAE 70 Teile Glycerol einige Kristalle Bromphenolblau einige Kristalle Xylencyanol 20 Teile 200 mM EDTA, pH=8
Ladepuffer für die Sequenzgelelektrophorese (1x):	5 Teile deionisiertes Formamid 1 Teil 50 mg/ml Dextran-Blau in 25 mM EDTA, pH=8
Probenpuffer für SDS-Gele (2x):	6% (w/v) SDS 25% (v/v) Trenngelstock 10% (v/v) β -Mercaptoethanol 10% (v/v) Glycerol
Ladepuffer für RNA- Agarosegelelektrophorese (1x):	120 μ l 10xMOPS 250 μ l Formamid 175 μ l Formaldehyd (37%) 50 μ l Blaumarker 50 μ l Ethidiumbromid (1:1000 Verdünnung der Stammlösung) Aufbewahrung bei -70°C
Laufpuffer für RNA- Agarosegelelektrophorese (10xMOPS):	0,4 M MOPS, pH= 7 0,1 M Natrium-Acetat

Material

10 mM EDTA
gelöst in DEPC-Wasser

SDS-PAGE und Western Blot

Transferpuffer:

25 mM Tris/HCl
0,19 M Glycin
20% (v/v) Methanol
0,05% (w/v) SDS

Blockingpuffer:

10% (w/v) Magermilchpulver in
PBS-Puffer

Sekundärantikörperlösung:

Peroxidase-gekoppelter Antikörper;
je nach Firmenvorschrift in 5%iger
PBS-Milch oder 3%igem BSA-PBS verdünnt

SDS-Gel-Laufpuffer:

0,025 M Tris/HCl
0,1% (w/v) SDS
0,2 M Glycin

2.4. Lösungen

β -Mercaptoethanol-Lösung zur Abspaltung von Hefeoberflächenproteinen: 100 mM
(Endkonzentration in Lösung)

- Coomassie-Blau-Lösung:

Coomassie brilliant blue 250	1 g
Methanol	450 ml
Wasser	450 ml
Essigsäure	100 ml
Coomassie Entfärbelösung:	
Methanol	450 ml
Wasser	450 ml
Essigsäure	100 ml

- Ponceau-Rot-Lösung:

Ponceau-Rot	2 g
Trichloressigsäure	30 g
Sulfosalicylsäure	30 g
Wasser	100 ml

- Lösungen für die Plasmidisolation nach der GFX Microplasmid-Prep-Methode (Amersham):

<u>Lösung I:</u>	100 mM Tris/HCl (pH=7,5)
	10 mM EDTA
	400 μ g/ml RNaseI
<u>Lösung II:</u>	1 M NaOH
	5,3% (w/v) SDS (5,3 fach konz.Lsg.)

vor Gebrauch des 250 Prep-Kits Zugabe von 65 ml H₂O_{dest}

Lösung III: gepufferte Lösung mit Acetat und chaotropen Salzen

Waschpuffer: Tris-EDTA-Puffer (10 mM Tris/HCl; pH 8,0, 1mM EDTA)

Material

vor Gebrauch mit 100 ml Ethanol absolut auf eine Endkonzentration (80%).

- Lösungen für die GFX PCR-DNA und Gel-Banden Aufreinigungsmethode (Amersham):

Capture-Puffer: gepufferte Lösung mit Acetat und chaotropen Salzen

Waschpuffer: Tris-EDTA-Puffer (10 mM Tris/HCl; pH 8,0, 1 mM EDTA),

vor Gebrauch mit Ethanol absolut auf eine Endkonzentration von 80% auffüllen.

- Lösungen für die Isolierung von mRNA mit dem FastTrack Kit 2.0 (Invitrogen):

Stock-Puffer: 200 mM NaCl

200 mM Tris (pH=7,5)

1,5 mM MgCl₂

2% (w/v) SDS

Protein/RNase-Inhibitor: Mischung aus Proteasen

Bindungs-Puffer: 500 mM NaCl

10 mM Tris-Cl (pH=7,5)

in DEPC-Wasser

Low-Salt-Wash-Puffer: 250 mM NaCl

10 mM Tris-Cl (pH=7,5)

in DEPC-Wasser

Elutionspuffer: 10 mM Tris-Cl (pH=7,5)

in DEPC-Wasser

- PEG/NaCl (zum Fällern der Phagen): 20% Polyethylen glycol 6000
(PEG)
2.5 M NaCl
Anschließend autoklaviert

- Imidazolösung zur Elution der löslichen Fab-Antikörper:

100-200 mM Imidazol

Proteinase Inhibitor Cocktail

(Nacaila Tesc inc)

- Trypsinlösung für die Zellkultur:

0,05% Trypsin

PBS (Ca²⁺ und Mg²⁺ frei)

- EDTA-Lösung für die Zellkultur:

1% EDTA

PBS (Ca²⁺ und Mg²⁺ frei)

2.5. Gele

- Sequenzgel

30 ml Sequagel XR (30% Acrylamid-Mix aus 29,2% Acrylamid und 0,8% N,N'-Dimethyl-Bisacrylamid) + 7,5 ml Puffer Sequagel complete + 400 µl DMSO; filtern; + 300 µl APS

- SDS-Polyacrylamidgele

Tabelle 3: Exemplarische Zusammensetzung eines SDS-Polyacrylamid-Geles.

Gelkomponenten	Trenngel (12%)	Sammelgel (5%)
H ₂ O	3,3 ml	0.68 ml
Acrylamidmix (30%)*	4 ml	0.17 ml
1,5M Tris (pH=8,8)	2,5 ml	/
1,0M Tris (pH=6,8)	/	0,13 ml
SDS (10%)	0,1 ml	0.01 ml
APS (10%)	0,1 ml	0,01 ml
TEMED	0,004 ml	0,001 ml

* enthält 29,2% Acrylamid und 0,8% N,N'-Methylenbisacrylamid

- DNA-Gele:

1,2% Agarose in 120 ml 1xTAE-Puffer durch aufkochen gelöst. Nach Abkühlen auf 50°C, Zugabe von Ethidiumbromid (Endkonzentration 10 µg/ml).

- RNA-Gele:

Agarose:	1,5 g Agarose
0,1% DEPC-Wasser:	80-120 ml
aufkochen, auf ca. 60°C abkühlen lassen	
10x MOPS-Puffer:	15 ml
Formaldehyd (37%):	15 ml

2.6. Zellstämme

- Bakterienstämme

Zur Plasmidamplifikation wurde der *E. coli*-Stamm DH5 α und zur Produktion und Expression der Fab-Antikörper der *E. coli* –Stamm TG1 eingesetzt.

- Hefestämme

Für die Generierung der cDNA-Bank, sowie für die Retransformation der aus dieser Bank gewonnenen Klone wurden *Saccharomyces cerevisiae* EBY-100 verwendet.

- Helferphagen

Zur Produktion von Fab-Antikörper präsentierenden Phagen wurde der Helferphagenstamm M13 K07 genutzt.

- Humane Zelllinien

Diverse humane Zelllinien verschiedener Primärtumore wurden für immunzytometrische und immunhistochemische Verfahren genutzt (Tabelle 7 gibt eine Übersicht der verwendeten Zelllinien).

2.7. Nährmedien

Nährmedien für Bakterien:

- LB (Luria-Bertani) Medium und Platten: 1% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt, 1% (w/v) NaCl, pH einstellen auf 7,0. Für Platten wurden 15 g Agar auf einen Liter H₂O zugegeben, danach autoklaviert. Bei Transformation mit Vektoren mit Ampicillinresistenz wurde das entsprechende Antibiotikum in einer Endkonzentration von 0,1 g/L eingesetzt.
- TY (Trypton/Yeast extract) Medium und Platten: 1,6% Trypton, 1% Hefe-Extrakt und 0,5% NaCl. Für Platten wurden 15 g Agar auf einen Liter H₂O zugegeben, danach autoklaviert. Je nach Bedarf, Zusatz von einem Antibiotikum (Ampicillin 100 µg/ml, Kanamycin 25 µg/ml, je Endkonzentration), sowie 2%, beziehungsweise 0,1% Glukose.
- M9-Salze: 42.5 g Na₂HPO₄·H₂O, 15.0 g KH₂PO₄, 2.5 g NaCl, 5.0 g NH₄Cl in 1L H₂O

Nährmedien für Hefen:

- Minimal Dextrose-Platten: 0,67% (w/v) YNB (mit Ammoniumsulfat, ohne Aminosäuren), 2% (w/v) Glukose, 0,01% (w/v) Leucine, 1,5% (w/v) Agar; YNB und Agar mit H₂O_{dest.} wurden autoklaviert, Glukose, sowie gelöstes Leucin sterilfiltriert, dann in Platten gegossen.
- YNB-CAA Medium: 0,67% (w/v) YNB (Ammoniumsulfat, ohne Aminosäuren), 2% (w/v) Glukose bzw. 2% (w/v) Galaktose, 0,5% (w/v) Casaminosäuren (beim Autoklavieren werden Spuren von Tryptophan zerstört, was den Selektionsdruck für die Hefen aufrecht erhält das entsprechende Plasmid zu behalten).
- YPD-Medium: 1% (w/v) Hefe-Extrakt, 2% (w/v) Pepton, 2% (w/v) Glukose.
- YPD-Platten: Zu YPD-Medium Zugabe von 2% (w/v) Agar.
-

Kulturmedien humaner Zelllinien: Gibco (Invitrogen), siehe Tabelle 7.

2.8. Vektoren:

- Die Hefeoberflächenexpressionsvektoren pYD1 (Invitrogen) und pYD1Rec:

Der Vektor pYD1 wurde konzipiert um Proteine zu exprimieren, zu sezernieren und auf die extrazelluläre Matrix zu translozieren. Dabei bedient man sich des α -Agglutinin-Rezeptors. Dieser wird durch das *AGA2*-Gen aus *Saccharomyces cerevisiae* codiert. Der α -Agglutinin-Rezeptor besteht aus zwei Untereinheiten, Aga2p und Aga1p, die durch Disulfid-Brücken verbunden sind. Aga1p sorgt für die Anheftung an die Zelloberfläche, während an den carboxy-terminalen Teil von Aga2p das darzustellende Protein fusioniert ist. Des Weiteren enthält pYD1 einen für das *AGA2*-Gen zuständigen Galaktose-induzierbaren Promotor, ferner ein Xpress™ Epitop, ein V5-Epitop, sowie ein 6xHis-Tag. Außerdem ist dem Plasmid ein Gen als Selektionsmarker zur Tryptophan-Synthese (TRP1) beigefügt.

Die *CEN6/ARS4*- Sequenz dient der stabilen episomalen Replikation in Hefen.

Zur Selektion und Replikation in *E. coli* dient ein Ampicillinresistenzgen und pUC-Origin.

Der zum Screening von Tumor-cDNA-Banken verwendete Vektor pYD1Rec unterscheidet sich von pYD1 dadurch, dass über Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *XhoI* die homologe Rekombinationssequenz aus dem Vektor pGADT7Rec (ein Yeast-Two-Hybrid-Screen Vektor von Clontech, Palo Alto, USA) einkloniert wurde. Diese Modifikation ermöglicht das Klonieren komplexer cDNAs über homologe Rekombination *in vivo*, ohne den Umweg der einzelnen Ligation, bei gleichzeitiger Oberflächenexpression.

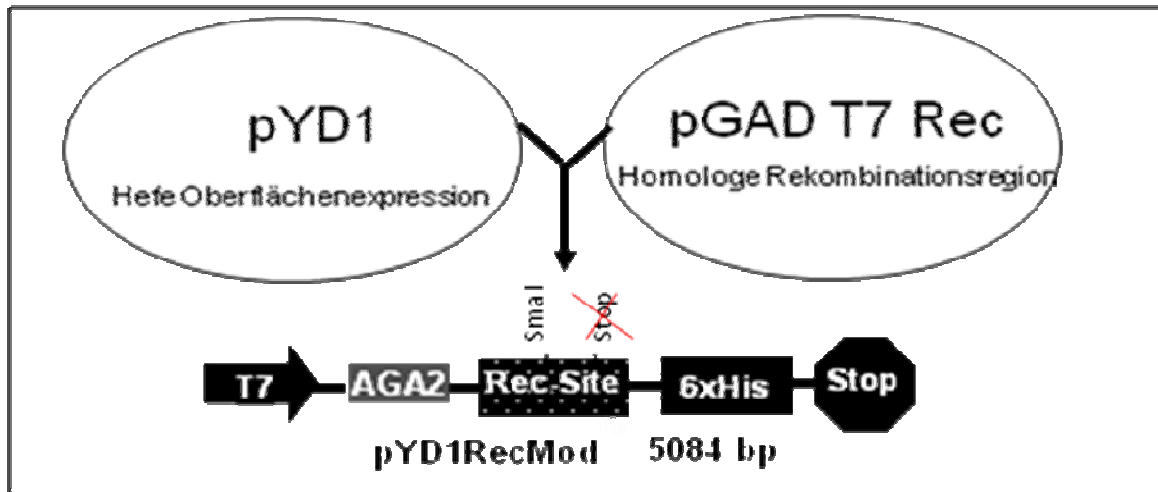


Abbildung 1: Vektorkarte des modifizierten pYD1-RecMod Vektors (Quelle: nach pYD1 users manual, Version 2004 und nach Wadle et al. 2005 (pYD1-Rec), modifiziert entsprechend des deletierten Stop-Codons).

- Der modifizierte pYD1-Rec: pYD1RecMod:

Der Nachteil von pYD1Rec liegt jedoch darin, dass in der homologen Rekombinationsstelle ein Stop-Codon im Frame des Aga2-Fusionsproteins existiert, welches die Nutzung des C-terminalen V5-Epitops, sowie des His-Tags verhindert. Um diese erneut nutzen zu können wurde das Stop-Codon durch Mutation zerstört. Dadurch wurde die vorhandene *XbaI*-Erkennungssequenz eliminiert und eine *GsuI*-Stelle (Erkennungssequenz: 3'-GACCCTC(N)₁₄-5') neu geschaffen. Bei einem Restriktionsverdau mit diesem Enzym entstanden nun zwei Fragmente der Größen 2636 bp bzw. 2454 bp.

Durch ein *SmaI*-Verdau wurde der Vektor linearisiert um die Rekombination mit der cDNA-Bibliothek zu ermöglichen.

- Der pCES-1 Vektor:

Der pCES-1 Vektor erlaubt die Klonierung humaner VL und VH Gene oder VLCL und VH Gene. Dieser enthält einige Schnittstellen: *ApaLI*, *XhoI*, *AscI*, *SfiI*, *PstI*, *BstEII* und *NotI* für die entsprechenden Restriktionsenzyme. Variable Gene können kloniert werden als *ApaLI* - *XhoI* oder *ApaLI* - *Asc* Fragmente (für VL oder VLCL) und *SfiI* / *PstI* - *BstEII* oder *SfiI* - *NotI* Fragmente (für VH oder VHCH1). Weiterhin finden sich 2 Signalsequenzen ("S"; pelB und die geneIII leader Sequenz), die C-Domain, ribosome Bindungsstelle (rbs), CH1 Domain, hexa histidine Tag (H6) und eine *c-myc* derivierte Sequenz(tag).

2.9. Oligonukleotide

pYD1- Primer

- Sequenzierung:
 - pYD1Modifikation (forward): 5'-TCA GTA ACG TTT GTC AGT AAT TGC-3'
 - 3'pYD1 sequence (reverse): 5'-ATG ATG ACC GGT ACG CGT AGA ATC-3'
- Mutagenisierung:
 - pYD1RecMod-5': 5'- GGC CGC CTC GGC CTC CAG AGG GTG ATC- 3'

Generierung der cDNA-Bank:

- Erststrangsynthese:
 - SMART III™Oligo-Primer:
5'- AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTG GCC ATT ATG GCC GGG-3'
 - CDS III (Oligo dT-)Primer:
5'- ATT CTA GAG GCC GAG GCG GCC GAC ATG-d(T)₃₀VN-3'*
 - CDS III/6 (random-)Primer:
5'- ATT CTA GAG GCC GAG GCG GCC GAC ATG-NNNNNN-3'*
- *N = A, G, C oder T; V = A,G, oder C
- cDNA-Amplifikation:
 - 5'-PCR-Primer: 5'- TTC CAC CCA AGC AGT GGT ATC AAC GCA GAG TGG- 3'
 - 3'-PCR-Primer: 5'- GTA TGC ATG CCC ACC CTC TAG AGG CCG AGG CGG CCG
ACA-3'

Fingerprint-Primer:

BACK Primer: 5'-AGCGGATAACAATTTACACAGG-3'

FORWARD Primer: 5'-TTTGTCGTCTTTCCAGACGTTAGT-3'

2.10. Patientenproben

Ethikvotum:

Diese Studie sowie die Kollektion der Seren- und Gewebeproben wurden von der Ethik-Kommission der Ärztekammer des Saarlandes genehmigt. Der entsprechende Antrag wurde am 05.10.1994 von der Ethik-Kommission angenommen (Aktenzeichen: Ethik-Komm./Ls).

Diese Studie wurde nach den Vorgaben der Deklaration von Helsinki durchgeführt.

Alle Proben wurden nach vorheriger ärztlicher Aufklärung durch Herrn PD. Dr. Kubuschok und schriftlicher Einwilligung der Probanden asserviert.

Die Gewebeproben:

Die 15 Gewebeproben wurden an der viszeralchirurgischen Klinik der Universität des Saarlandes (Direktor: Prof. Schilling) im Rahmen von Pankreatikoduodenektomien (Operation nach Kausch-Whipple) gesammelt.

Das Serengut:

Die Seren von 99 Pankreaskarzinompatienten, von 63 gesunden Blutspendern und von 14 Pankreatitispatienten wurden gesammelt und kryokonserviert.

Die folgenden Daten zum Patientenkollektiv sind insbesondere bei der statistischen Auswertung relevant. Das einzige Auswahlkriterium der Pankreaskarzinompatienten war die histologisch gesicherte Diagnose eines Pankreaskarzinoms. Die Tabelle 4 gibt eine Übersicht über die klinischen Parameter des Patientenpools.

Tabelle 4: Übersicht der binominal eingeordneten klinischen Daten der Pankreaskarzinompatienten:

Klinische Parameter	Geschlecht	Alter	Nodaler Status	Metastasen	Staging
Angaben	(m/w)	(über 60 Jahre/ unter 60 Jahre)	(pN+/pN-)	(M1/M0)	(Stadium 1-2 / Stadium 3-4)
Absolute Anzahl	52/43	62/35	24/21	41/43	20/64
Prozentualer Anteil	56%/44%	36%/64%	53%/47%	49%/51%	24%/76%

Die klinischen Daten der Tabelle 4 sind binominal kodiert. Dargestellt sind das Geschlecht (m/w), das Alter (über 60 Jahre/unter 60 Jahre), der nodale Status (pN+/pN-), die Metastasen (M1/M0) und das Staging (Stadium 1-2/Stadium 3-4). Für jeden Parameter sind die absoluten

Zahlen und die prozentualen Anteile aufgeführt. Die kleine Fallzahl (45) der nodal Untersuchten erklärt sich durch die geringe Zahl an operablen Pankreaskarzinomen (etwa 20%, siehe Einleitung). Die TNM Klassifikation und die Stadieneinteilung sind in der Einleitung zu ersehen. Die Lücken in den Angaben ergeben sich durch den Mangel an Informationen bei einem Teil der Patienten.

Die Kontrollgruppe besteht aus 63 Seren von gesunden Spendern, numeriert von 1 bis 63, sowie aus 14 Seren von chronischen Pankreatitispatienten (Nummern 1-14).

Tabelle 5: Übersicht der binominal eingeordneten klinischen Daten der Kontrollgruppen (gesunde Spender und Pankreatitispatienten):

Klinische Parameter	Geschlecht (m/w)	Alter (unter 60 Jahre /über 60 Jahre)
Absolute Anzahl	33/44	50/27
Prozentuale Anteil	41%/59%	32%/68%

Die klinischen Daten in Tabelle 5 sind binominal kodiert. Angegeben sind Geschlecht und Alter (in absoluter Anzahl und in prozentualem Anteil).

2.11. Kits

- BD Matchmaker Library Construction & Screening Kits (BD Biosciences, Heidelberg, Germany))
- pYD1 Yeast Display Vector Kit (Invitrogen)
- FastTrack 2.0 Kit (Invitrogen)
- Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Invitrogen)
- ProofStart PCR (Quiagen)
- *Saccharomyces cerevisiae* EasyComp Transformation Kit (Invitrogen)
- QuickChange Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)
- Sequitherm EXCEL II DNA Sequencing Kit (Epicentre)
- Plasmid maxi Kit (Quiagen)
- GFX Micro Plasmid Prep Kit (Amersham biosciences)
- BCA Protein Assay Kit (Pierce)

2.12. Geräte

- Thermal Cycler: Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- FACS-Sorter: Becton Dickinson™ FACSCalibur®, Heidelberg (FACS Core Facility Universität Mainz, Deutschland)
- FACS-Analyser: Becton Dickinson™ FACScan®
- Sequenzierautomat: LI-COR™ dNA sequencer model 4000L®
Rev. 02.23 (MWG™, München, Deutschland)
- ELISA-Reader: Wallac reader Victor 2 (Perkin Elmer, Waltham, USA)
- Photometer: Photometer (Eppendorf)

2.13. Computersoftware

Die Datenerfassung der FACS-Messungen erfolgte mittels BD CELLQuest[®] (für Apple[™] PowerMac[®]).

Für die Analyse der FACS-Daten und die graphische Darlegung der Ergebnisse wurden die Programme WinMDI[®], Version 2.8 und SigmaPlot2001[®], Version 7.0 (Sigma Software[™]) verwendet.

Die Datenerfassung der Sequenziergelelektrophorese erfolgte mit dem Programm LI-COR[™] BASE IMAGIR[®] Data Collection Vers. 02.31), die Auswertung mit dem Programm LI-COR[™] BASE IMAGIR[®] Image Analysis Vers. 04.0h (unter IBM[™] OS/2 warp4[®]).

Die Tabellen wurden mit Microsoft Excel 2005 für Windows XP erstellt. Zur statistischen Bearbeitung wurde SPSS 13.0 für Windows genutzt. Für die schriftliche Ausarbeitung der Arbeit kam Microsoft Word 2005 für Windows XP zur Anwendung. Für die Darstellung von Schaubildern und Graphiken wurden Microsoft Excel 2005 und SigmaPlot2001[®], Version 7.0 (Sigma Software[™]) genutzt.

Die erhaltenen DNA-Sequenzen wurden mittels der internetbasierten Sequenzdatenbank "BLASTN" (= Standard nucleotide-nucleotide BLAST / BLAST = Basic Local Alignment Search Tool; Altschul et al., 1997) am NCBI (= National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health (NIH), USA) bzw. bei GenomeNet (= Bioinformatics Center, Institute for Chemical Research, Kyoto University, Japan) auf Übereinstimmungen geprüft.

Die Bestimmung der aus der DNA-Sequenz resultierenden Aminosäuren-Sequenz der Proteine erfolgte mittels ExPASy-"Translate" (DNA → Protein) des Swiss Institute of Bioinformatics.

Die Suche zur Einfügung neuer Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen bei der Mutagenisierung von pYD1Rec wurde mit dem online verfügbaren Programm Webcutter 2.0 vollzogen.

Die Prädiktion der MHC Epitope erfolgte unter www.syfpeithi.de

3. Methoden

3.1. Bakterien-Techniken:

Kultivierung von *E. coli*-Stämmen (Maniatis et al., 1989): Suspensionskulturen von *E. coli* wurden in LB-Medium und *E.coli*-Plattenkulturen auf LB-Agarplatten kultiviert. Zur Selektion und Amplifikation transformierter Bakterien sind dem Medium die Antibiotika Ampicillin (100 µg/ml) beziehungsweise Kanamycin (30 µg/ml) zugesetzt worden.

Herstellung kompetenter Bakterien (CaCl₂/RbCl-Methode, Kushner, 1978): Als kompetente Bakterien bezeichnet man Stämme, die eine erhöhte Fähigkeit besitzen, Fremd-DNA während einer Transformation aufzunehmen. Der gewünschte Bakterienstamm wurde in LB-Medium angeimpft und 12-16 h hochgezogen. Die Bakterien konnten anschließend 1:25 in neuem Medium verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 kultiviert werden. Die Kulturen wurden auf Eis inkubiert und dann abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde mit Transformationspuffer versetzt und bei 4°C gekühlt. Nach der Zentrifugation wurden die Bakterien in 50% Glycerol in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Transformation (Lederberg und Cohen, 1974): Als Transformation bezeichnet man eine Methode, bei der gelöste DNA in eine Bakterienzelle eingeschleust wird. Während einer halbstündigen Inkubation von Bakterien-DNA auf Eis, lagert sich die negativ geladene DNA spontan an Bakterienzellwände an. Bei einem Hitzeschock von 45 s bei 42°C wird die Zellmembran der Bakterien kurzzeitig permeabel und die DNA kann ins Innere der Zellen gelangen. Die Bakterien regenerieren sich kurze Zeit auf Eis und werden in SOC-Medium bei 37°C vorkultiviert. Diese Vorkultur kann dann auf einer LB-Platte ausgestrichen werden.

3.2. Hefe-Techniken:

Hefekultivierung (Boder und Wittrup 1997): Flüssigkulturen von *Saccharomyces cerevisiae* wurden bei 30°C in CAA+Glukose-Medium geschüttelt bis zu einer OD600 von 2-5. Die Hefen wurden in PBS gewaschen und zentrifugiert. Etwa 1/10 des Hefepellets wurde in CAA+Galaktose-Medium angeimpft und bei 20°C 48 Stunden geschüttelt. Dieser Vorgang diente der Induktion der Oberflächenexpression. Auf MD-Leu Platten konnten Hefen bei 30°C kultiviert werden.

Herstellung kompetenter Hefen und Transformation: Diese Techniken wurden mit dem *S.c* EasyComp™ Transformation Kit von Invitrogen durchgeführt.

3.3. DNA-Techniken:

3.3.1. Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien

TENS-Methode: Die Aufreinigung von Plasmid-DNA nach der TENS-Methode beruht auf der alkalischen Lyse von Zellen. Das Bakterienpellet wird in P1- und TENS-Puffer aufgenommen. Dabei wird durch die Komponenten NaOH, dem Detergenz SDS und Tris-Base die Lyse vorangetrieben. Durch Zugabe von Na-Acetat werden Proteine, genomische DNA und andere Zellbestandteile präzipitiert. Lediglich die im Verhältnis zu den anderen Bestandteilen relativ niedrigmolekularen Plasmide und Salze bleiben in der Lösung. Diese werden nach dem Abzentrifugieren der Zelldebris mit eiskaltem Ethanol (95%) gefällt und pelletiert. Nach dem Waschen in eiskaltem 70%igem Ethanol, wobei ausgefällte Salze entfernt werden, wird die DNA in H₂O_{dest.} aufgenommen.

Micro-Plasmid-Prep Methode (Amersham). Bei Bedarf an hoch reinen DNA-Proben kam dieser Kit zum Einsatz. Alle Schritte wurden nach Angaben des Herstellers vollzogen.

Isolation von Plasmid-DNA aus Hefen (Modifizierte TENS-Methode). Da Hefen eine robuste Zellwand aus Chitin, sowie eine ausgeprägte Glycokalix besitzen, ist eine einfache alkalische Lyse nicht ausreichend. Daher wurden die Hefezellen mit gleichen Volumen an Glasbeads auf einem Vortexer lysiert. Die restlichen Isolierungsschritte sind identisch mit der TENS-Methode.

3.3.2. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration an Nukleinsäuren wurde photometrisch ermittelt. Nukleinsäuren haben ihr Adsorptionsmaximum bei 260 nm. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz kann auf die Konzentration der Lösung rückgeschlossen werden: $c = A/(e \times d)$, wobei c die Konzentration, A die Absorption, e den Absorptionskoeffizienten und d die Küvettendicke wiedergeben.

3.3.3. Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

(Mullis et al., 1985)

Die genauen Zyklusbedingungen, mit denen DNA-Amplifikationen durchgeführt wurden, sind im Folgenden aufgelistet:

3 min	94°C	Denaturierung	} x 30 Zyklen
50 s	94°C	Denaturierung	
50 s	58°C	Annealing	
3 min	72°C	Elongation	
10 min	72°C	Elongation	

Das beschriebene Programm wurde im Eppendorf Mastercycler Gradient durchgeführt. Die in einer PCR eingesetzten Konzentrationen sind exemplarisch für einen 20 µl Ansatz in folgendem Pipetierschema zusammengefasst worden. Zur Amplifikation größerer DNA-Mengen wurden Ansätze mit 100 µl Endvolumen verwendet.

Tabelle 6: Exemplarische Zusammensetzung eines PCR-Reaktionsansatzes

PCR-Komponenten	Eingesetzte Volumina	Konzentration der Ausgangslösungen
Primer 1	0,3 µl	25 mM
Primer 2	0,3 µl	25 mM
dNTP-Mix	0,3 µl	10 mM/dNTP
Taq-10 x PCR-Puffer	2 µl	10 x
Taq-Polymerase	0,1 µl	5 U/µl
DNA-Template	maximal 2 µl	0,2-2 µg/µl

Die Ansätze wurden mit sterilem H₂O_{bidestilliert} auf 20 µl Endvolumen aufgefüllt. Nach der PCR wurde der Ansatz in einem Agarosegel analysiert.

3.3.4. Ligation von DNA-Fragmenten

(Sgaramella et al., 1970)

Während einer Ligation wird die Verknüpfung zueinander passender DNA-Fragmente von dem Enzym Ligase katalysiert. Es wurde die aus dem T4-Bakteriophagen stammenden T4-Ligasen verwendet. Die ATP-abhängige Ligation der beiden Fragmente erfolgte über

Phosphordiesterbindungen. Für die Reaktion wurden äquimolare Mengen an Vektor und dem zu inserierenden DNA-Fragment bei 4°C für 12-16 h mit 100 U Enzym in Ligase-Puffer inkubiert.

3.3.5. Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

(Maniatis et al., 1989)

Ein Restriktionsverdau wurde durchgeführt, indem 0,5 µg DNA in analytischen Ansätzen, bzw. bis zu 10 µg zu präparativen Zwecken in einem 20 µl Ansatz mit 2 µl 10-fach Restriktionspuffer von 2-5 U's¹ Enzym pro µg DNA geschnitten wurden. Bei Doppelverdauen (z.B. *EcoRI* und *XhoI*) wurde die doppelte Pufferkonzentration gewählt, um unspezifisches Schneiden der Enzyme (Sternaktivität) zu verhindern. Alle Ansätze wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.3.6. Agarosegelelektrophorese

Prinzipien der Agarosegelelektrophorese (Maniatis et al., 1989): Es wurden 1%ige Agarosegele zur Auftrennung von DNA-Fragmenten bis 10 kb und 3%ige Gele für einen Trennbereich von 0,1-2 kb hergestellt und verwendet. Ethidiumbromid wurde zu einer Endkonzentration von 2 µg/ml in 1x TAE Puffer verdünnt. Die Agaroselösung wurde in Gelkammern gegossen und mit Kämme versetzt. Als Längenmarquer diente die GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder von MBI Fermentas.

Isolation von DNA aus Agarosegelen (GFX Gel Band Purification Kit, Amersham): Die DNA Isolation erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

3.3.7. Sequenzierung von DNA-Fragmenten

(Sanger et al. 1977, modifiziert)

Die 4 Ansätze werden nach der Sequenzier-PCR in 4 nebeneinander liegenden Spuren eines Sequenziergels aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Reihenfolge der in Gellaufichtung detektierten fluoreszierenden Signale in den 4 Didesoxynukleotidspuren gibt die Basenabfolge im Fragment wieder.

Die Sequenzierungen wurden mit Hilfe des SequiTherm EXCEL™II Kits der Firma Biozym durchgeführt. Die Sequenzier-PCR wurde mit dem nachfolgenden Programm durchgeführt:

¹ Unter einem Unit (U) Enzym versteht man die Menge an Enzym, die notwendig ist, um 1 µg DNA bei 37°C vollständig zu verdauen.

5 min	95°C	
30 s	95°C	} x 30 Zyklen
30 s	57°C	
1 min	70°C	

Nach der PCR wurde jeder Ansatz mit dem im Kit enthaltenen Stop/Loading Puffer versetzt und bei 4°C aufbewahrt.

3.3.8. Herstellung eines DNA- Sequenzgels

(Maniatis et al., 1989)

Ein 6%iges Polyacrylamidgel wurde als Sequenzierungsgel gewählt. Die Pufferreservoirs wurden mit 1xTBE-Puffer gefüllt. Die Gelelektrophorese erfolgte bei ca. 1500 V und dauerte je nach Länge der zu analysierenden DNA-Fragmente 8-14 Stunden. Die gesammelten Daten wurden im Komputerspeicher gespeichert.

3.4. RNA-Techniken

Herstellung RNase-freien Wassers (DEPC-Wasser): (Maniatis et al., 1989): Zur Herstellung RNase-freien Wassers wurde DEPC in destilliertem Wasser 1:1000 verdünnt und über Nacht inkubiert. Das anschließende Autoklavieren inaktivierte DEPC.

Isolierung von Gesamt-RNA aus Tumorgeweben (TRIZOL™-Methode) (Chomczynski und Sacchi, 1987): Zur Gewinnung der gesamten-RNA wurden 15 Pankreaskarzinomgewebeproben genutzt (siehe auch 2.10). Diese Isolierungsmethode stellt eine Einzelschritt RNA-Isolierungsmethode dar, die auf der GITC-Methode von Chomczynski und Sacchi beruht. Das TRIZOL™-Reagenz ist eine monophasische Lösung aus Phenol und GITC.

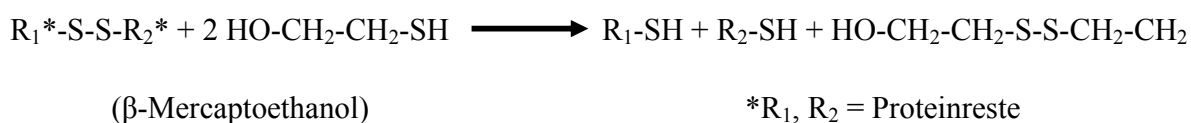
Isolierung von messenger-RNA (FastTrack Kit 2.0, Invitrogen): Die mRNA besitzen an ihrem 3'-Ende ein Poly(A)-Tail aus etwa 200 Adenylsäureresten. Auf diesem Prinzip basiert auch die Isolierungsmethode mit dem FastTrack Kit.

RNA-Agarosegelelektrophorese: Die isolierte RNA wurde in einem denaturierenden Gel kontrolliert. Nicht degradierte RNA lässt zwei deutliche Banden erkennen: die 28s und die 18s ribosomale RNA. Bei unverdauter RNA sollte die obere Bande (28s) ausgeprägter sein als die untere (18s). Die RNA-Gelelektrophorese richtet sich nach dem Prinzip der DNA-Gelelektrophorese. Durch Zugabe von Formaldehyd in das Agarosegel wird die Bildung von Sekundärstrukturen verhindert, welche die Laufeigenschaften der RNA-Moleküle beeinflussen. Die Auftrennung erfolgte innerhalb von 30 bis 60 Minuten bei 100 Volt.

Reverse Transkription und cDNA-Bank: Die Generierung der cDNA-Bank wurde mit dem MATCHMAKER Library Construction & Screening Kit bewerkstelligt. Es wurden sowohl random- als auch oligo(dT)-Primer eingesetzt. Als Ausgangsmenge wurden für die Erstrangsynthese 1,2 µg Patienten- mRNA eingesetzt.

Die Transformation von cDNA und *SmaI*-linearisierten pYD1Rec (500ng/µl) in kompetente EBY100 und Rekombination beider. Als Kontrollen wurde *SmaI*-geschnittener Leervektor (250ng), sowie ungeschnittener Vektor (250ng) ebenfalls transformiert. Als Rekombinationskontrolle wurde das große SV40 T-Antigen (mit entsprechenden Rekombinationsenden) mit linearisiertem pYD1Rec transformiert.

Da Aga2p mit dem membranständigen Aga1p kovalent über Disulfidbrücken verknüpft ist, eignet sich das Reduktionsmittel β -Mercaptoethanol zum Abspalten der gewünschten Oberflächenproteine. Dabei werden die Disulfide (Cystine) nach der folgenden Reaktionsgleichung (Abbildung 2) zu Sulfhydrylen (Cysteine) umgewandelt. Dies führt zu einer Freigabe der Proteine ins Medium, welche nach der Chloroform-Methanol-Methode gefällt werden können:



SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli et al., 1970; Maniatis et al., 1989): Zur Analyse der exprimierten Proteine wurden 12%ige Trenngele eingesetzt.

Nach der Polymerisation wurden die Gele in einer Kammer eingespannt, mit dem Laufpuffer in Kontakt gebracht und mit den Proben beladen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 200 V für ca. 3 Stunden.

Immunblot (Westernblot) (Towbin et al., 1979): Die für den Proteintransfer eingesetzte Polyvinyliden-Fluorid-Membran (PVDF Membran, Immobilion-Membran) wurde vor dem Zusammenbau in Methanol benetzt und anschließend in PBS äquilibriert. Die eigentliche Proteinübertragung erfolgte mittels des Semi-Dry-Verfahrens. Das Gel wurde mit der Membran in Kontakt gebracht und zwischen 2 Lagen feuchtem Whatmanpapier eingespannt. Das Gel und die Membran wurden so orientiert, dass die Proteine auf die Membran in Richtung Anode

wandern. Der Transfer erfolgte bei 400mA für eine halbe Stunde. Der Bloterfolg wurde durch Färbung mit Ponceau-Rot überprüft. Nach Entfärben wurde die Membran in 3% PBS-BSA für 30min zum Blocken inkubiert. Anschließend wurde die Membran für immunologische Färbungen genutzt. Als Längenmarker wurde die BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen) genutzt.

Immunologischer Nachweis von Proteinen: Der Proteinnachweis erfolgte über einen Erstantikörper, welcher bei 4°C unter leichtem Schwenken für 1 bis 2 h inkubiert wurde. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS, folgte die Behandlung mit dem Zweitantikörper an den Meerettich-Peroxidase kovalent gekoppelt ist. Die Inkubation dauerte 2 h bei 4°C in 3% PBS-BSA unter Schwenken. Die Membran wurde anschließend erneut mit PBS gewaschen.

Färbung von Proteinen mit Coomassie-Farbstoff: Das Polyacrylamidgel wurde in Coomassie-Blau-Färbelösung getränkt. Dabei wurden alle Proteine durch nicht kovalente Anlagerung des Farbstoffs blau gefärbt. Zum Entfärben wurde das Gel in einer Coomassie-Entfärbelösung geschwenkt. Der Farbstoff bleibt nur in den Proteinen erhalten und das Gel kann photographisch dokumentiert werden

Nachweisreaktion mit ECL+ (Enhanced chemiluminescence): ECL+ stellt eine nicht radioaktive Nachweismethode Peroxidase-gekoppelter Antikörper dar. Diese Reaktion wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt (ECL+-Kit, Amersham). Bei der Oxidation des Luminols wird Licht der Wellenlänge 428 nm emittiert, das einen lichtempfindlichen Röntgenfilm (Fuji™ Medical X-Ray Films 03E260, Düsseldorf) schwärzt.

3.6. Immunfluoreszenz-Techniken:

Induktionsfärbungen: Die Zugabe von Galaktose sowie die Kultur bei 20°C fördern die Aktivität des Gal1 Promoters. Dieser ist zuständig für die Expression des *Agalp* Genes. Die Transkription erlaubt die Synthese und Expression der entsprechenden Oberflächenprodukte, die durch Immunfluoreszenz nachgewiesen werden können (Abbildung 3). Es stehen drei detektierbare Domänen zur Verfügung: das Xpress Epitop, das V5 Epitop und das 6xHisTag. Routinemäßig werden das Xpress Epitop und der His Tag genutzt.

Die Abbildung 4 zeigt die Reihenfolge der Oberflächenexpression. Zur Induktionsüberprüfung werden Hefen nacheinander bei 4°C mit anti Xpress Antikörper, Biotin conjugated Anti Mouse IgG goat Fcγ Fragment spezifisch und Phycoerythrin Streptavidin inkubiert. Die Hefen wurden zwischen den einzelnen Schritten mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Hefen durchflusszytometrisch gemessen.

Immunfluoreszenzfärbung von Hefen (Mischo et al., 2003, modifiziert): Die Seren wurden zunächst in einer pYD1-Leerhefe/PBS Lösung präabsorbiert (im Verhältnis 1:1, Serumkonzentration 1:100). Dieser Schritt dient der Entfernung unspezifisch bindender Antikörper aus den Seren. Die induzierten Hefen wurden mit 100 µl Pankreas-Ca Patientenserum (Verdünnung 1:100 in PBS) versetzt. Die Inkubationszeit betrug 60min bei gelegentlichem Rütteln. Als Sekundärantikörper diente ein Biotin-gekoppelter mouse anti-human IgG Fcγ und als Fluoreszenzfarbstoff Streptavidin-gekoppeltes R-Phycoerythrin (Abbildung 3). Zwischen den einzelnen Färbeschritten wurden die Hefen mit PBS gewaschen. Die Fluoreszenzdaten wurden durchflusszytometrisch akquiriert und ausgewertet.

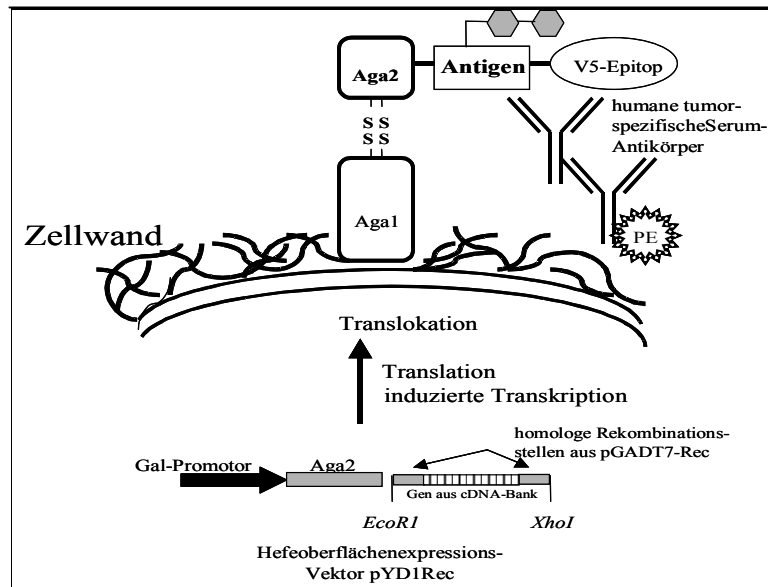


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Gal-Promoter abhängigen Transkription des Aga2p Genproduktes, der Oberflächenexpression des pYD1Rec Vektors und einer Immunfluoreszenzfärbung mit humanen Antikörpern und sekundärem Färbesystem (Quelle: pYD1-users manual, Invitrogen 2004 und Wadle et al., 2006, modifiziert entsprechend der Neuerungen von pYD1Rec).

Die FACS Messung und Datenerfassung: Auf der FSC-Achse ist die gemessene Zellgröße aufgetragen, auf der SSC-Achse die Granularität, welche die Morphologie umreißt. Die Spannungen beider Axen werden so eingestellt, dass die Zellpopulationen etwa äquidistant zu beiden Axen liegen, mit leichter Präferenz in Richtung der FSC Achse. Die Spannung entlang der Fluoreszenz 2 Achse wird so angelegt, dass die Gaußsche Verteilungskurve der Population mit der geringsten Fluoreszenzstärke gerade noch mit der Endstrecke ihres aufsteigenden Astes zu sehen ist. Aus der Vielzahl an Hefen, welche vom FACS erfasst werden, muss eine gewisse Selektion erfolgen. Aufgrund dieser Angaben wurde das Gate (als R1 bezeichnet) so gewählt, dass lediglich nicht zu kleine Einzelzellen mit geringer Granulation erfasst werden.

3.7. Methoden der Phage display Technologie

(Clackson et al., 1991, Hoogenboom et al., 1992 und 1997, McCafferty et al., 1990 und Smith et al., 1997)

3.7.1. Beschreibung der Fab Library

Die in dieser Arbeit verwendete Phagemidbank exprimiert ein sehr großes, naives Fab Repertoire mit einer Diversität von $4,2 \times 10^{10}$ verschiedenen Fab-Antikörpern. Die große Diversität erlaubt die Selektion von Antikörpern mit Spezifität für praktisch jedes Antigen (deHaard et al., 1999). Ein Überstand gelöster infektiöser Phagen wurde in Aliquots von DYAX SA, Lüttich, Belgien bezogen.

3.7.2. Infektion von TG1 *E.coli* durch infektiöse Phagen

Um die Diversität der Phagen-Bank in ihrer Gesamtheit zu erhalten, wurden die Phagen in der hundertfachen Menge der Diversität der Phagen-Bank eingesetzt. Damit die Infektion der TG1-Bakterien durch die Phagen optimal verläuft, müssen sich diese in der logarithmischen Wachstumsphase befinden (entspricht einer OD600 von 0,5). Die infektiösen Phagen selbst tragen in ihrem Genom ein Resistenzgen gegen Ampicillin, wodurch infizierte Bakterien im Ampicillin haltigen Milieu überleben können (siehe Selektion unter 3.7.4.). Dies ermöglicht die Selektion von infizierten Bakterien.

TG1-Bakterien wurden in 2x TY-Medium aus einer Glycerin-Kultur angeimpft und für 12-16h bei 37°C hochgezogen. Diese Suspension wurde in 2x TY-Medium verdünnt (1:100) und bei 37°C geschüttelt. Die Bakterien wuchsen bis zum Erreichen der logarithmischen Phase.

Im Verhältnis 1:5 wurden Phagen und Bakterien gemischt und bei 37°C in 2x TY geschüttelt. Das resultierende Pellet konnte auf 2x TY AG Platten ausgestrichen werden. Die Inkubation erfolgte für 12-16h bei 30°C, die gebildeten Kolonien konnten abgekratzt und in 15%igem Glycerol bei -70°C eingefroren werden.

3.7.3. Ermittlung des Phagentiters

Um die in einer Selektionsrunde eingesetzten (input) und anschließend vom Antigen eluierten (output) Menge an infektiösen Phagen zu bestimmen, wurde je eine Verdünnungsreihe in 10-100er Schritten in 2x TY-Medium pipetiert. Seriell erfolgen die Dilutionen in 10-100er Schritten in einem Gefäß mit TG1-Bakterien in der logarithmischen Wachstumsphase. Diese Mischung wird bei 37°C für 30 min geschüttelt. Mit den verdünnten Phagen wurden exponentiell wachsende *E. coli* infiziert und auf 2x TY AG Platten ausplattiert.

Der Phagentiter lässt sich dann anhand der folgenden Formel ermitteln:

$$\# \text{ cfu /ml} = (\# \text{Kolonien}) \times (1/\text{Dilution}) \times (1/\text{ausplattierte Fraktion der Kultur}) \times 2$$

3.7.4. Selektion spezifischer Antikörper gegen bestimmte Peptide

Phagenproduktion für Selektionsrunden: Infizierte Bakterien wurden in 2x TY AG auf einer OD600 von höchstens 0,05 eingestellt und bis zu einer OD600 von 0,5 bei 37°C kultiviert. Die Bakterien und die Helferphagen wurden im Verhältnis von 1:20 mit Helferphagen M13K07 gemischt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Das Pellet wurde in 2x TY AK resuspendiert und bei 30°C über Nacht geschüttelt. Die Phagen im Überstand wurden mit 1/5 des Volumens an PEG auf Eis gefällt. Diese Lösung wurde bei 7000 rpm für 20min zentrifugiert und das die Phagen enthaltende Pellet in PBS gelöst. Dieser Vorgang wurde 2-3 Mal wiederholt. Durch mehrfaches zentrifugieren konnten die Phagen im resultierenden Überstand gewonnen werden.

Selektionsschritte zur Ermittlung selektiver Antikörper: Das Prinzip beruht auf der Bindung spezifischer Fab-Antikörper (Binder) an biotinylierten Zielpeptiden. Die Streptavidin Dynabeads binden, dank der hohen Affinität von Streptavidin für Biotin, an diese Peptide. Im magnetischen Feld werden diese Beads in den Gefäßen gehalten (und mit ihnen gebundene Peptide inklusive Phagen), während der Überstand (enthält nicht bindende Phagen) herausgewaschen werden kann. Zunächst wurden jeweils Phagenüberstand und Streptavidin Dynabeads in MPBS geblockt. Die Phagen wurden anschließend nur mit den Streptavidin Dynabeads in Kontakt gebracht, um Streptavidinbinder zu entfernen (Präabsorbtion). Nach Zentrifugation (5 min, 2000 rpm) wurde der Überstand entfernt (dieser enthält die nicht gebundenen Phagen) und mit 20-500 nM des

biotinylierten Target-Peptid inkubiert. Mit jeder Selektionsrunde wird die Peptidkonzentration vermindert, um den Selektionsdruck zu erhöhen. In der zweiten Runde betrug die Konzentration 100 nmol und in der dritten Runde 20 nmol.

Die Dynabeads wurden hinzugegeben und magnetisch im Gefäß gehalten. Diese wurden mehrmals mit MPBS/0,1% Tween gewaschen und zentrifugiert (1500 rpm), um niederaffine Phagenbindungen zu entfernen. Im Anschluss wurden die Dynabeads mit 100 mM Triethylamin rotiert. Das alkalische Milieu trennt die Bindung der Phagen zu den biotinylierten Peptiden. Die Streptavidin-Dynabeads wurden erneut im magnetischen Feld entfernt. Die so eluierten Phagen wurden mit 1 M Tris-HCL (pH=7,4) neutralisiert und konnten neue TG1 Bakterien infizieren (siehe 3.7.2.). In dieser Arbeit wurden drei solcher Selektionsrunden durchlaufen.

3.7.5. Testung der Spezifität der selektierten Binder

Produktion von Phagen in einer 96er Well Microtiter Platte: Einzelne Kolonien wurden in 96er-Well-Kulturplatten in 2x TY AG angeimpft und über Nacht bei 30°C geschüttelt. Aus diesen Vorkulturen wurden neue 2x TY AG Platten angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD600 von 0,5 expandiert. Jedes Loch wurde mit 2×10^9 pfu M13K07 Helferphagen versetzt und bei 37°C, 30 Minuten geschüttelt. Das Pellet wurde in 2x TY AK resuspendiert und für 12-16h bei 30°C geschüttelt (glukosefrei). Im Überstand befanden sich die Antikörper-präsentierenden Phagen, die für weitere Analysezwecke genutzt werden konnten.

Die Vorkulturplatte wurde mit Glycerol (60% Endkonzentration) versetzt, bei -70°C weggefroren.

ELISA zur Evaluation der Spezifität der Fab-Gen3 Fusionsprodukte: Die Spezifität der einzelnen Phagen-Klone wird mittels ELISA evaluiert. Hierfür werden die benötigten biotinylierten Peptide auf einer Nunc®-Maxisorb-Platte gebunden (Hoogenboom et al., 2000). Die Phagen wurden während einer Stunde in MPBS bei Raumtemperatur inkubiert, 3 Mal mit 0,1% Tween und 2 Mal mit PBS gewaschen und bei je 1500 rpm zentrifugiert. Mit einem Anti-M13- HRP Antikörper wurden die gebundenen Phagen detektiert (30min bei 4°C). Es folgten analoge Waschschrte. Die Reaktion wurde durch das TMB Peroxidase Kit in Gang gesetzt (15min) und der Farbumschlag durch 2N H₂SO₄ abgestoppt. Anschließend konnte die Absorption bei 450nm mit einem Photometer gemessen werden.

3.7.6. Produktion löslicher Fabs

Produktion löslicher Fabs im 96er Wellformat: Singulär infizierte TG1 Bakterien wurden aus einer Glycerol-Stocklösung in 2x TY-AG auf einer 96er Well Platte angeimpft und bei 30°C über Nacht geschüttelt. Aus diesen Vorkulturen wurde 2x TY 0,1%AG auf neuen Platten angeimpft und bis zu einer OD600 von 0,9 hochgezogen. Anschliessend wurde die Fab-Produktion mit IPTG (Endkonzentration 2mM/ml) induziert und bei 30°C, 12-16h geschüttelt.

Produktion löslicher Fabs im Kolbenformat: Aus einer Vorkultur (2x TY AG über Nacht bei 30°C) wurden xxx ml 2x TY 0,1%AG 1:100 inokuliert und bei 37°C bis zu einer OD600 von 0,8-1,0 kultiviert. Nach Induktion mit 2mM IPTG, wurde für 4 Stunden bei 30°C geschüttelt. Das bakterielle Pellet wurde bei -20°C über Nacht eingefroren. In eiskaltem TS wurden die Pellets resuspendiert und in einem neuen Gefäß auf Eis gelagert. Das ursprüngliche Gefäß wurde mit TS/H₂O im Verhältnis 1:3 gewaschen. Die Suspension wurde der Ersten hinzugefügt und 20 min auf Eis inkubiert. TS ist ein Lysepuffer und ermöglicht die Freisetzung der Fab-Antikörper aus dem Periplasma. Diese Lösung wurde anschliessend bei 4000 rpm 10 min zentrifugiert. Der zellfreie Überstand enthält die periplasmatische Fraktion.

3.7.7. Aufreinigung löslicher Fabs

Hierfür werden Talon-Beads genutzt, welche Co²⁺ Ionen besitzen. Die 6x His getaggtten Fab-Antikörper werden an freien N-Atomen des Histidins durch die Co²⁺ Atome gebunden. Durch Zugabe von Imidazol werden die Kupferatome oxidiert und die Fabs eluiert. Die Talon beads (Bindungsaffinität von 2,5 mg/2ml) wurden vorab mehrmals in 0,1% Tween gewaschen und mit den periplasmatischen Fraktionen bei 4°C inkubiert (im Verhältnis 10:1). Nach mehrmaligem Waschen mit 0,3% Tween, wurden die Fab-Antikörper in einer Säule durch Zugabe von 200 mM Imidazol eluiert (2faches Beadsvolumen mit Zusatz von Proteinaseinhibitor). Die resultierenden Eluate wurden aliquotiert und zum Entfernen des Imidazols in großem PBS Volumen über Nacht dialysiert.

3.7.8. Evaluierung der Diversität selektionierter Klone durch PCR-Amplifikation und DNA-Fingerprinting

PCR Reaktion: Die DNA eines bakteriellen Klons wurde extrahiert. Selektiv wird das Insert des pCES-1 Vektors amplifiziert (siehe PCR 3.3.3.).

Fingerprinting der amplifizierten DNA durch BstN-1 Verdau (Jeffreys et al., 1985): Den PCR-Produkten wurde nach vollendeter Amplifikation jeweils folgender Master Mix hinzugefügt:

NEB2 Puffer (10x)	3,6µl
Wasser	14,1µl
BstN-1(10U/µl)	0,3µl

Die DNA wird 2-3 Stunden bei 60°C verdaut. Nach Zusatz von Ladepuffern wird der Ansatz auf 3% Agarosegel bei 100 V laufengelassen. Die Auftrennung wird unter einer UV-Lampe dokumentiert.

3.7.9. Quantifizierung der Fab-Antikörper

Die Quantifizierung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers (BCA-Kit).

3.7.10. Immunzytometrische Färbungen

Die Fab-Antikörper besitzen einen 6xHis Tag, einen *c-myc*-Tag und stellen selbst eine Antigenstruktur dar. Jedes dieser Antigene kann mittels kommerzieller Antikörper nachgewiesen werden.

3.8. Methoden der Zellkultur

(Scherer et al., 1953)

Die Zelllinien: Die Tabellen 7a und 7b geben die Zelllinien wieder, die in dieser Arbeit genutzt worden sind, sowie ihr Ursprungsgewebe und das jeweilige Kulturmedium.

Tabelle 7a: Übersicht der bearbeiteten Zelllinien, der korrespondierenden Tumorentität und des Kulturmediums.

Zelllinie	SKmel23	SKmel37	Hep3b	Hep2G	Paca44	Panc1	Patu	Aspc1
Tumorentität	Melanom	Melanom	HCC	HCC	PankreasCa	PankreasCa	PankreasCa	PankreasCa
Kulturmedium	RPMI 1640	RPMI 1640	DMEM	DMEM	RPMI 1640	RPMI 1640	DMEM	DMEM
Zusätze	10% FCS	10% FCS	10% FCS	10% FCS	10% FCS	10% FCS	10% FCS	10% FCS
	L- Glutamat	L- Glutamat	L- Glutamat	L- Glutamat	L- Glutamat	L- Glutamat	L- Glutamat	L- Glutamat
	AMAB	AMAB	N-EAA	N-EAA	N-EAA	N-EAA	N-EAA	N-EAA
			Hepes	Hepes	Hepes	Hepes	Hepes	Hepes
			AMAB	AMAB	AMAB	AMAB	AMAB	AMAB

Tabelle 7b: Übersicht der bearbeiteten Zelllinien, der korrespondierenden Tumorentität und des Kulturmediums.

Zelllinien	HeLa	Alab	MCF7	SKBR7	CAMA	HT1080	CMS5A	U266
Tumorentität	CervixCa	MaCa	MaCa	MaCa	MaCa	Fibrosarkom	Fibrosarkom	Myelom
Kulturmedium	RPMI 1640	CMRL 1066	CMRL 1066	CMRL 1066	CMRL 1066	RPMI 1640	RPMI 1640	RPMI 1640
Zusätze	10% FCS	10% FCS	10% FCS	10% FCS	10% FCS	10% FCS	10% FCS	10% FCS
	L- Glutamat	L- Glutamat	L- Glutamat	L- Glutamat	L- Glutamat	L- Glutamat	L- Glutamat	L- Glutamat
	AMAB	N-EAA	N-EAA	N-EAA	N-EAA	AMAB	AMAB	AMAB
		Hepes	Hepes	Hepes	Hepes		β- Mercaptoethanol	
		AMAB	AMAB	AMAB	AMAB			
		Ciproxin	Ciproxin	Ciproxin	Ciproxin			

Immunzytometrische Färbungen der Zelllinien (Hoogenboom et al., 2004; Held et al., 2004):

Wie bereits unter 3.7.5.10. erwähnt, können verschiedene sekundäre Antikörper zum Nachweis der Fab-Antikörper Bindung genutzt werden. Standardmäßig wurden die anti-c-*myc* und die anti Human Fab spezifischen Färbungen genutzt. Die Zellen wurden auf 96 Well-Platten verteilt, jedes Well enthielt 500000 Zellen. Die Fab-Antikörper wurden, im Falle einer Einzelfärbung, in etwa 10 µg/ml Konzentration eingesetzt und eine Stunde auf einem Plattenschüttler bei 4°C inkubiert. Der sekundäre Antikörper war anti-c-*myc*, der tertiäre anti-Mouse-Fab spezifisch und der Farbstoff Phycoerythrin-Streptavidin. Zwischen den Färbeschritten wurde jeweils mit 0,1% Tween und PBS gewaschen. Abschließend konnte die Fluoreszenz am Durchflusszytometer gemessen werden.

3.9. Immunhistochemische Methoden

Herstellung von Paraffinblöcken (Conger et al., 1949; Wollum et al., 1952): 80×10^6 Zellen wurden 24 Stunden in einer 10% Formalinlösung eingebettet, in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und gehärtet (70%, 80%, 96%, 99%). Anschließend wurden diese in Xylol inkubiert und in 60°C warmes Paraffin getaucht. Diese Masse konnte nun in eine Form gegossen werden und die erstellten Paraffinblöcke entweder in einem Serienschnittmikrotom in 2-4 µm dicke Schnitte geteilt oder in Tissue-Micro-array Technologie bearbeitet (siehe 3.9.3.) werden.

Die Färbung von Paraffinschnitten (Hoogenboom et al., 2002; Jarutat et al., 2006): Die auf Objektträgern gespannten Schnitte oder Micro-arrays wurden erst durch kaltes und dann durch warmes Wasser geführt. Diese Objektträger wurden über Nacht bei 40°C getrocknet und in einem Xylolbad entparaffinisiert. Eine absteigende Alkoholreihe erlaubte die Rehydrierung der Schnitte (99%, 96%, 80% und 70%). Die Kernfärbung erfolgte mit hydrophilem Hämalaun. Die Zellkörper wurden mit 2%iger Essigsäure entfärbt. Die Gegenfärbung erfolgte mit hydrophilem Eosin. Der Überschuss wurde mit Alkohol (96%, anschließend 99%) entfernt. Die endogene Peroxidase-Aktivität der Gewebe wurde mit 0,1% H_2O_2 geblockt. Unspezifische Antikörperbindungen wurden durch Inkubation der Gewebe mit humanem Serum unterbunden. Die Fab-Antikörper wurden bei Raumtemperatur in 1% BSA und 0,1% Tween-PBS mit anti-c-myc Antikörper (1:500) vorinkubiert. Diese Lösung wurde auf den Schnitten bei Raumtemperatur inkubiert. Zwischen jedem der Färbeschritte wurde mit 0,1%igem Tween-PBS gewaschen. Die Bindung wurde mit einem anti Mouse HRP conjugated (1:200 in MPBS) detektiert.

Die Tissue Micro-array Technologie (DeRisi et al., 1996, Kalliomeni et al., 2001): Diese Methode bietet den Vorteil der gleichzeitigen Behandlung einer großen Zahl an verschiedenen Proben auf einem Objektträger. Aus einem Zellblock wurde eine Stanze entnommen, dieser Vorgang wurde in vielen verschiedenen Blöcken wiederholt. Die Stanzen wurden in einer Gießkammer geordnet und erneut in Paraffin gegossen, die so entstandenen Blöcke konnten fein geschnitten und weiterbehandelt werden.

3.10. Epitop-Vorhersage

(Rammensee et al., 1999)

Epitope sind über Ankersequenzen an MHC-Moleküle gebunden. Diese Ankersequenzen besitzen präferentielle Stellen im Epitop. Zahlreiche dieser bevorzugten Ankersequenzen sind bekannt. Ihre Präsenz korreliert mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für die Präsentation dieses Epitopes in ein MHC-Molekül (Rammensee et al., 1995). Das Prinzip des SYFPEITHI-Prädiktionsalgorithmus beruht auf der Vergabe von Punkten. Je adäquater die Ankersequenzen, desto höher der Wert. Umgekehrt sind bei besonders inadäquaten Sequenzen auch negative Werte möglich. Der höchste erreichbare Score ist 36. Die Höhe des Scores, insbesondere wenn er größer als 25 ist, korreliert positiv mit einer höheren Wahrscheinlichkeit der Präsentation durch das MHC-Molekül. Allerdings ist dieses System nicht absolut, auch bekannte Epitope der MHC-Moleküle erhalten nicht zwangsläufig hohe Scores.

4. Ergebnisse

Eine Pankreaskarzinom spezifische cDNA Bank wurde zunächst hergestellt, in den pYD1 Vektor rekombinant kloniert und die Expression der kodierten Proteine auf der Hefenoberfläche induziert. Die 10 interessantesten Klone, wurden einer serologischen Reihenuntersuchung unterzogen. Mit einer Phage-Display-Fab-Library wurden, gegen den serologisch reaktivsten Klon, spezifische Fab-Antikörper selektiert und produziert. Mit diesen spezifischen Antikörpern konnte das betreffende Antigen in diversen Zelllinien detektiert werden.

4.1. Herstellung einer cDNA Library

Die mRNA wurde aus Pankreaskarzinomgewebeproben isoliert und zur cDNA-Synthese genutzt. Die Bank wurde in pYD1 rekombinant kloniert und in Hefen transformiert. Schließlich wurde die Bank auf Repräsentativität untersucht.

Isolierung der mRNA: Aus 15 Pankreaskarzinomgewebeproben wurde die Gesamt-RNA (Abbildung 4a) extrahiert und die mRNA (Abbildung 4b) isoliert.

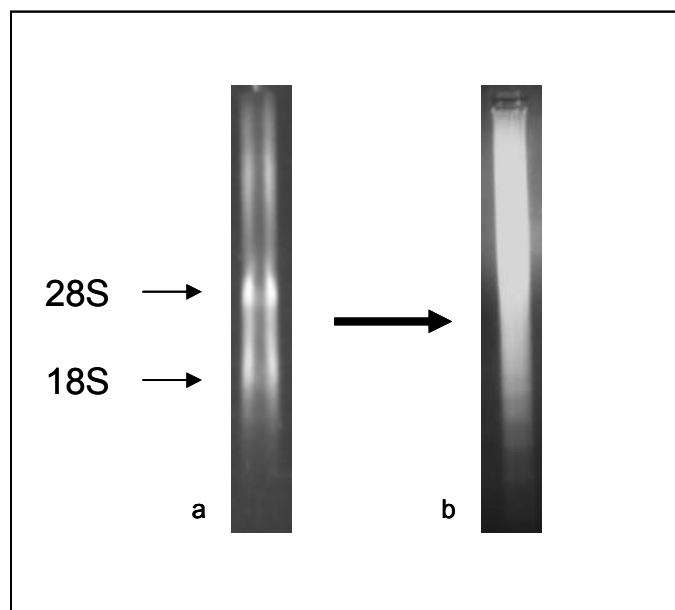


Abbildung 4: Gelelektrophoretische Auftrennung der Gesamt- (a) und mRNA (b).

Die Gesamt-RNA enthält die rRNA (28S und 18S Banden in Abbildung 4a). Nach der Isolierung der mRNA können sich keine Banden in der Lauffront mehr darstellen (Abbildung 4b).

cDNA-Synthese: Um die Baseninformation der mRNA in ein Vektorsystem einbauen zu können (pYD1), wurde die mRNA in cDNA transkribiert. Diese wurde in das Plasmid pYD1-Recmod rekombinant kloniert, in kompetente EBY100-Hefen transformiert und ausplattiert. Die anhand der Kulturplatten ausgezählten Kolonien erbrachten eine Schätzung von 600000 Primär-Transformanten. Die Hefen-Titer-Bestimmung ergab 670000 cfu/ μ l.

Repräsentanz der cDNA-Bank: Die Güte einer Bank ist abhängig von ihrer Diversität. Um diese zu untersuchen, wurden 13 Hefekolonien beispielhaft angeimpft und *Eco/Xho*-verdaut (Abbildung 5).

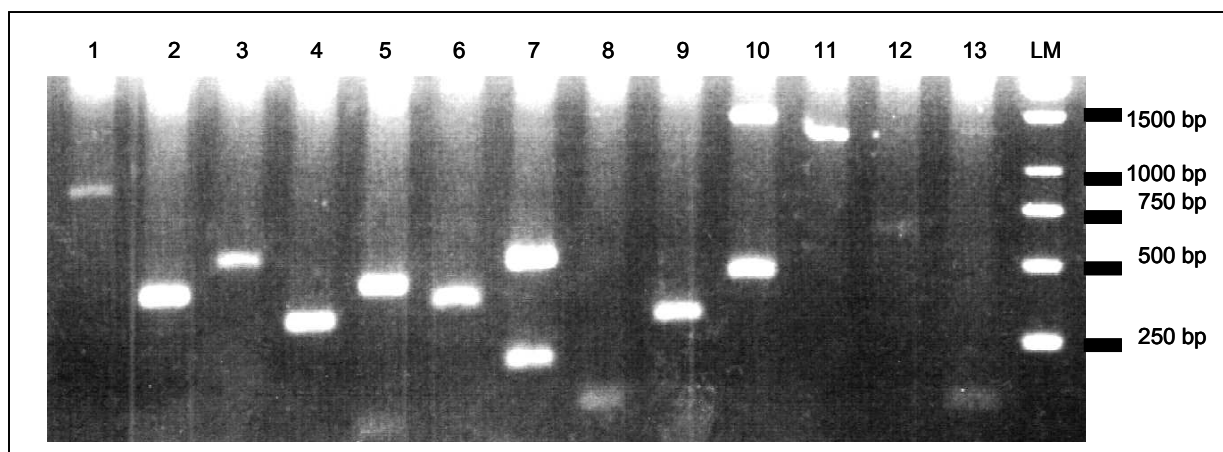


Abbildung 5: *Eco/Xho* Verdau von 13 pYD1-cDNA-Klonen. Die verdauten Klone weisen folgende Längen auf: Klon 1: 1000bp; Klon 2: 400bp; Klon 3: 500bp; Klon 4: 300bp; Klon 5: 500bp; Klon 6: 500bp; Klon 7: 750bp (2 Inserts, nicht monoklonal); Klon 8: 250bp; Klon 9: 300bp; Klon 10: 500bp (2 Inserts, nicht monoklonal); Klon 11: 1500bp; Klon 12: 750bp; Klon 13: 200bp.

Diese Klone wurden anschließend ansequenziert und mit der Online-Datenbank BlastN abgeglichen (Tabelle 8):

Tabelle 8: Blastergebnis der Repräsentanz-Untersuchung

Klonnummer	Accession-number	Beschreibung
1	AF103559	Homo sapiens isolate donor Z clone Z25K immunoglobulin kappa light chain variable region, mRNA
2	BC050644	Homo sapiens ribosomal protein L12, mRNA
3	BC002658	Homo sapiens ribosomal protein S27 (metalloproteinase 1), mRNA
4	HSM807160	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp686N12252 (from clone DKFZp686N12252)
5	NM_012461	Homo sapiens TERF1 (TRF1)-interacting nuclear factor 2 (TINF2), mRNA.
6	NM_022551	Homo sapiens ribosomal protein S18 (RPS18), mRNA.
7	BC015103	Homo sapiens elastase 3A, pancreatic (protease E), mRNA
8	AL160154	Human DNA sequence from clone RP11-447N10 on chromosome 13
9	BC036051	Homo sapiens egl nine homolog 2 (C. elegans), mRNA (cDNA clone)
10	BC022098	Homo sapiens immunoglobulin lambda locus, mRNA
11	BC000374	Homo sapiens ribosomal protein L18, mRNA
12	BC004251	Homo sapiens actin, beta, mRNA
13	AB064228	Homo sapiens IGL mRNA for immunoglobulin lambda light chain VLJregion

Die Diversitäts-Untersuchung ergab 3 IgG assoziierte Klone (1, 10 und 13), 4 Housekeeping-Klone (2, 3, 6 und 11), sowie 6 bekannte mRNA Klone. Hochgerechnet auf die 600000 Klone dieser Bank und den geschätzten 0,01% Leertransformanten, enthält die Bank etwa 300000 bekannte und unbekannte Klone.

Eine cDNA-Expressionsbank konnte somit hergestellt und in Hefen rekombinant kloniert werden. Diese Bank wurde anschliessend auf immunogene cDNA-Hefeklone untersucht.

4.2. Screening nach cDNA-Hefeklonen mit immunogenem Potential

Die cDNA-Bank wurde mit einigen Pankreaskarzinompatientenseren inkubiert und immunogene Hefeklone mittels high-speed-cell-sorting isoliert. Diese Klone wurden sequenziert, und die 10 interessantesten Klone zur serologischen Reihenuntersuchung bestimmt.

Sortvorgang: Der Sortvorgang dient der Selektion von cDNA-Hefeklonen, die mit autoreaktiven Patientenseren färbbar sind. Die induzierte Hefe-cDNA-Bank wurde mit 20 Pankreaskarzinompatientenseren inkubiert. Nach der Serenbehandlung wurde sowohl mit anti-humanen Fc γ -Phycoerythrin konjugierten Antikörpern (rot, zur Serenantikörperanfärbung), als auch mit anti-Xpress und anti-Mouse-Fc γ -Alexa-488 Konjugat (grün, zur cDNA-Oberflächenexpressionsfärbung) gefärbt. Zur Kalibrierung wurden positive Einzelfärbungen durchgeführt. Die Positivkontrollen für beide Färbesysteme wurden an den Systemachsen orientiert (Abbildung 6- 2- und 3-A). Die Positivkontrolle der Doppelfärbung orientierte die doppelt positiven Hefen im rechten oberen Quadranten (Abbildung 6-4A).

Ergebnisse

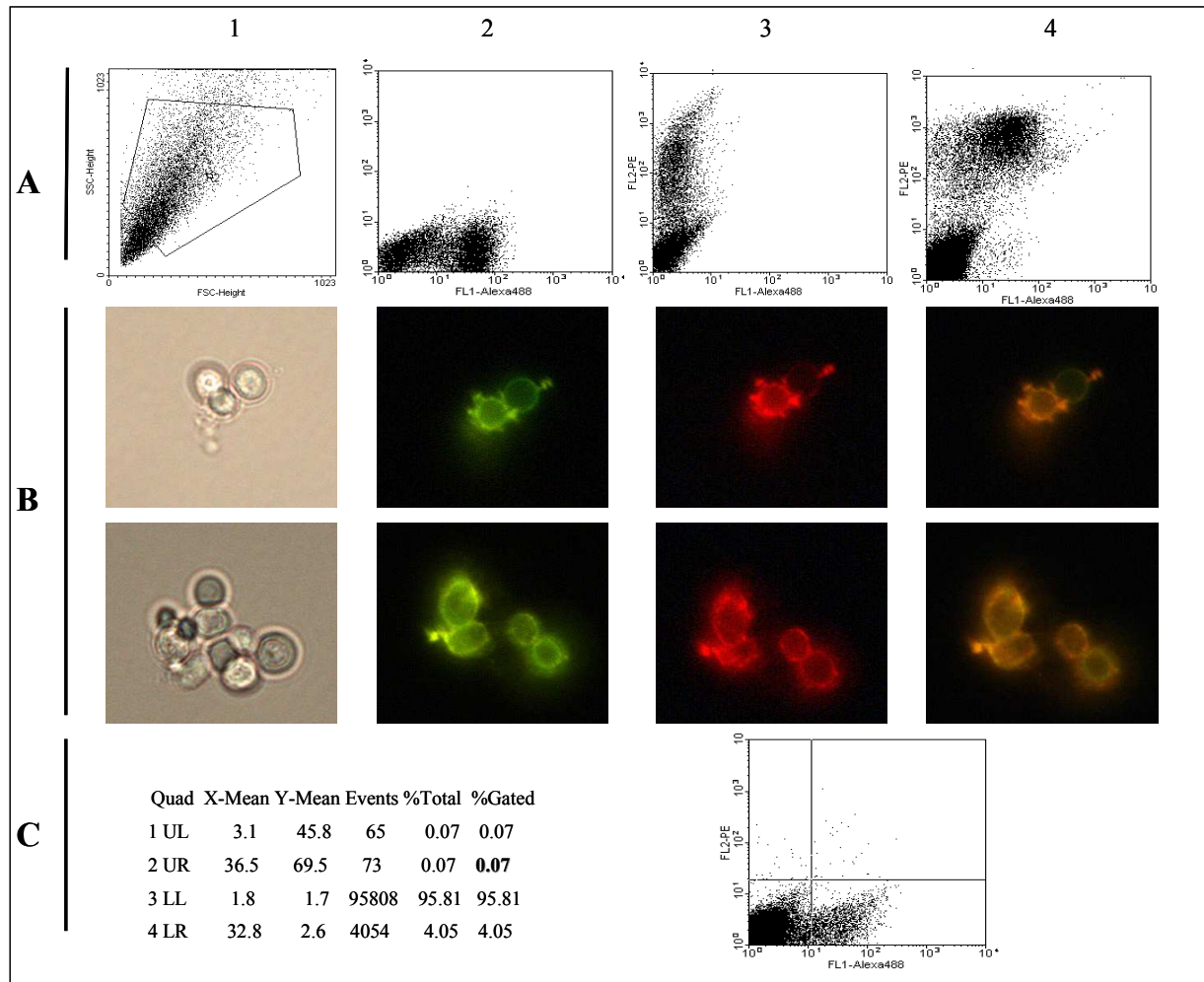


Abbildung 6: Überblick über die Sortfärbungen: Die Graphen der Abbildung 6A stellen jeweils an ihrer Abszisse den FSC und an ihrer Ordinate den SSC dar. A-1: Verteilung der Hefepopulation im SSC/FSC-System mit Gate; A-2: Verteilung der Hefepopulation nach Induktionsfärbung und Ausrichtung auf die FSC-Achse; A-3: Verteilung der Hefepopulation nach Färbung mit positivem humanem Serum; A-4: Verteilung der Hefepopulation nach Doppelfärbung mit anti Xpress und Alexa 488 sowie Serum und Strep.PE; B-1 bis 4: Optisches Korrelat zu A 1-4 im Fluoreszenzmikroskop, Alexa488 leuchtet grün, Strep PE rot und die Doppelfärbung orange; C: Verteilung der Hefebank im SSC/FSC System nach Doppelfärbung, und statistische Auswertung der Verteilung auf die 4 Quadranten.

Abbildung 6-B beinhaltet fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von ungefärbten Hefen (B-1), PE positiven Hefen (B-2), Alexa positiven Hefen (B-3) und der doppelt positiven Hefen (B-4). In C ist die statistische Verteilung der Hefen im Vier-Quadrantensystem nach Doppelfärbung der Hefebank mit den Patientenseren zu sehen. 0,07% der Hefen waren doppelt positiv. Mit einem FACS-Sorter konnten 400 dieser Klone selektiv gesammelt und anschliessend weiter charakterisiert werden. 100 Klone wurden aussortiert, da diese von dem sekundären Färbesystem stark angefärbt wurden und somit für IgG assoziierte Proteine kodierten. Eine Vielzahl an

weiteren Klonen wurde auf Grund ihres ubiquitären Vorkommens aussortiert. Die verbliebenen potentiell interessanten Klone sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Selektion potentiell interessanter Klone zur Weiteruntersuchung: Nach Abgleich mit der NCBI BlastN Internetdatenbank wurde Tabelle 9 erstellt. Die potentesten Klone sollten identifiziert werden und einer serologischen Reihenuntersuchung unterzogen werden.

Annexin A11 (Klon 482) wurde bereits im Rahmen des Mammakarzinoms identifiziert (Fernandez et al., 2004) und mit vermehrter Autoreaktivität in Patientenseren beschrieben (Fernandez et al., 2004). Als Mammakarzinom assoziiertes Protein, stellt dieser Klon eine potentiell interessante Zielstruktur dar.

DJ1 (Klon 496) wurde als Onkogen definiert (Nagabuko et al., 1997). Es ist mit dem Mammakarzinom (Nagabuko et al., 1997), sowie mit dem Lungenkarzinom (Mac Keigan et al., 2003) assoziiert. Des Weiteren wurden bei Patienten mit DJ1 positiven Lungenkarzinomen vermehrt Antikörper gegen DJ1 detektiert (Le Naour et al., 2001). Diese starke Karzinomassoziation und insbesondere die bereits beschriebene Autoreaktivität machen ihn für eine serologische Reihenuntersuchung interessant.

Der Klon 165 liegt außerhalb der bekannten MMP11-CDS. MMP11 ist mit Malignomen assoziiert, insbesondere mit dem Pankreaskarzinom (von Marschall et al., 1997 und Jones et al., 2004). Weiterhin ist dieser ORF bislang unbekannt.

Die Klone 13, 16 und 498 kodieren für lange Peptide. Diese Klone besitzen keine Homologien mit bekannten Genen.

Die Klone 483-1, 483-2, 166 und 26 weisen hohe Homologien mit bekannten cDNA auf. Jedoch werden diese Klone in einem anderen Leserahmen abgelesen. Es resultieren kurze Peptide. Vordaten unserer Arbeitsgruppe (bisher nicht veröffentlicht) weisen darauf hin, dass solche Klone vermehrt immunogen wirken.

Ergebnisse

Die Klone 13, 16, 26, 165, 166, 482, 483-1, 483-2, 496 und 498 wurden zur serologischen Reihenuntersuchung bestimmt. Diese sollen zunächst im Detail charakterisiert werden.

Die zur weiterführenden Untersuchung bestimmten Klone stellt Tabelle 9 in gelb dar. Dort sind die Klonnummern (Intern), die accession number und die Genregion für jeden Klon dargestellt. Darüber hinaus ist der Leserahmen, der in der Hefe abgelesenen cDNA vermerkt, im Vergleich zur bekannten CDS: im Leserahmen der CDS (in) oder ausserhalb des Leserahmens der CDS (out).

Tabelle 9: Übersicht der potentiell interessanten Klone nach Charakterisierung:

Pankreaskarzinomklone			Bemerkung
Klon	Accession number	Homologie	
2	NM_004047	Homo sapiens ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 21 kDa, V0	out
7	AB088082	Homo sapiens MHC-class I antigene (HLA-F), mRNA	in
13	BX649125	unknown, Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp686H1748	in
16	NM_019606	Homo sapiens hypothetical protein FLJ20257, mRNA	in
26	NM_004739	Metastasis-associated 1-like 1 (MTA1L1)	out
30	NM_000991	Homo sapiens ribosomal protein L 28 (RPL 28), mRNA	in
45	BX647891	unknown Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp686P14102	in
94	BC071661	Homo sapiens myosin, light polypeptide 6, alkali, smooth	in PaCa unterexprimiert
146	NM_000041	Apolipoprotein E (APOE), mRNA	out
165	NM_005940	Homo sapiens matrix metalloproteinase 11 (stromelysin 3) (MMP11), mRNA.	langer ORF nach CDS-Stop in 3'UTR
166	NM_005940	Homo sapiens matrix metalloproteinase 11 (stromelysin 3) (MMP11), mRNA.	out
182	BT007356	Chymotrypsinogen B1, mRNA	in
211	NM_021009	Homo sapiens ubiquitin C, mRNA	in
244	NM_052969.1	Homo sapiens ribosomal like protein L39 (RPL39L), mRNA	in
812	D26351	Type 3 inositol 1,4,5-triphosphatase receptor (ITPR3), mRNA	out
886	AY275537	NADH dehydrogenase subunit 4L + SU 4	in
482	NM_001157	Homo sapiens annexin A11, mRNA	in PaCa überexprimiert
483-1	AF036956	Homo sapiens neuroblastoma apoptosis-related RNA binding protein	in
483-2	AY316538	Homo sapiens interleukin 15 receptor, alpha (IL15RA) gene	in
485	BC036203	Homo sapiens testis enhanced gene transcript (BAX inhibitor 1), mRNA	in
487	BT006893	GAPDH, mRNA	in
496	D61380	Homo sapiens mRNA for DJ-1 protein	Onkogen (in)
498	BI837623	unknown long ORF, 603086834F1 NIH_MGC_120 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:5225793 5'	Organ: pooled pancreas and spleen: EST

4.3. Charakterisierung der selektierten cDNA Klone

Der Vorgang der Charakterisierung ist eine von Sahin et al., 1995 geprägte Methode, die die genaue Untersuchung der cDNA Klone beinhaltet. Dies erfordert die Bestimmung der Insertlänge, die Bestimmung der Lokalisierung dieser Klone in bekannten Genen (mit Leserahmenbestimmung), sowie den Nachweis der Transkription und Translation dieses DNA Abschnittes in *Saccharomyces cerevisiae* auf Proteinebene.

Bestimmung der Insertlängen: Die pYD1-cDNA der Klone wurde mit *Eco RI* und *Xho I* verdaut und die cDNA-Insertlänge in der Agarosegelelektrophorese bestimmt.

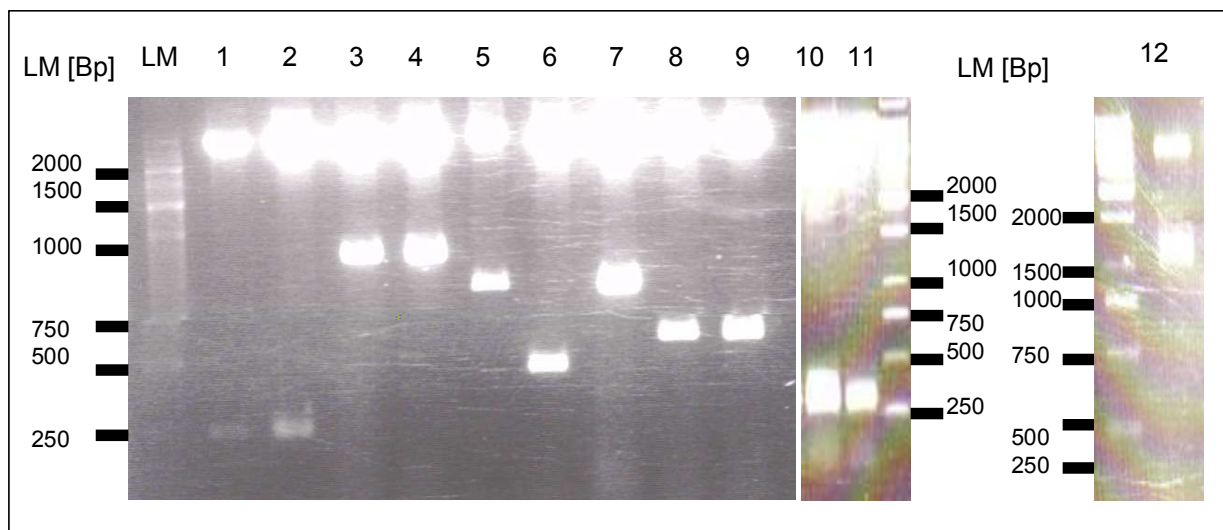


Abbildung 7 Gelelektrophoretische Auftrennung von pYD1-cDNA Klone nach restriktionsenzymatischem Verdau mit *Eco/Xho*. Zur Belegung der Lauflinien siehe Tabelle 10.

Die Interpretation der gelelektrophoretischen Auftrennung dieser cDNA Klone (Abbildung 7), zeigt die Tabelle 10. Dabei konnten folgende Insertlängen für die Klone ermittelt werden:

Tabelle 10: Übersicht der gelelektrophoretisch ermittelten Basenlängen:

Laufnummer	1 und 2	3 und 4	5	6	7	8	9	10	11	12
Klon	13	16	482	483-1	483-2	498	496	165	166	26
Basenlänge (bp)	250	1250	1000	500	1000	750	750	350	350	1750

Die in jeder Laufspur vorhandene, bei etwa 5000bp laufende Bande stellt den pYD1-Leervektor dar. Alle Hefeklone tragen ein cDNA Insert. Die genaue Sequenz und die Lokalisierung im Genom wurden mittels Sequenzierung ermittelt.

Sequenzierung der pYD1-cDNA: Jede pYD1-cDNA wurde sequenziert und mit der NCBI BlastN Datenbank abgeglichen. Ziel war die Identifikation der cDNAs. Es wird jeweils das komplette Gen schematisch dargestellt:

- in blau ist die CDS gekennzeichnet
- in rot das Insert des entsprechenden Klons
- in grün der translatierte Abschnitt

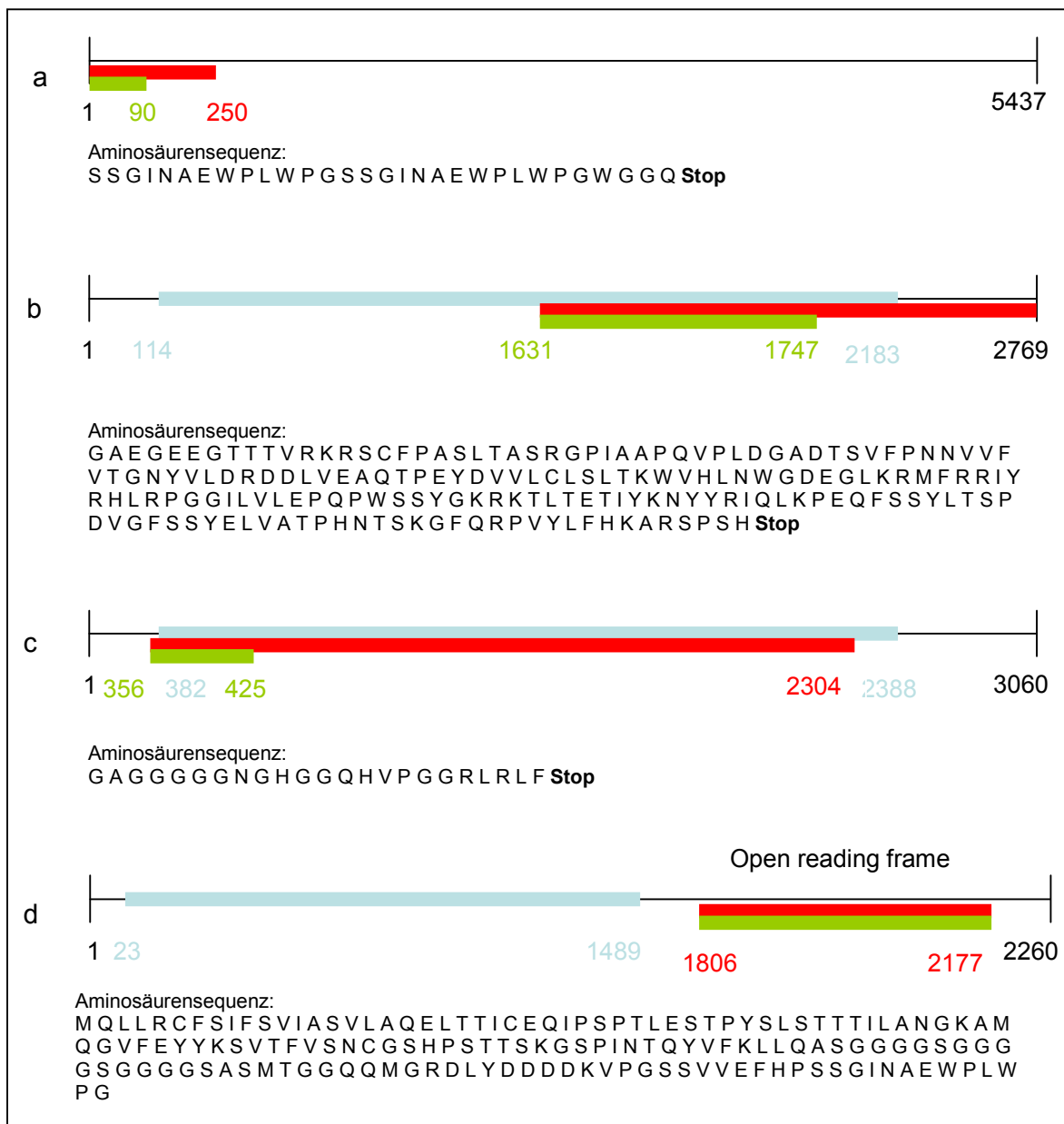


Abbildung 8 a-d: Schematische Darstellung der Blastergebnisse und der entsprechenden Aminosäuresequenzen: a: für Klon 13; b: für Klon 16; c: für Klon 26; d: für Klon 165.

Ergebnisse

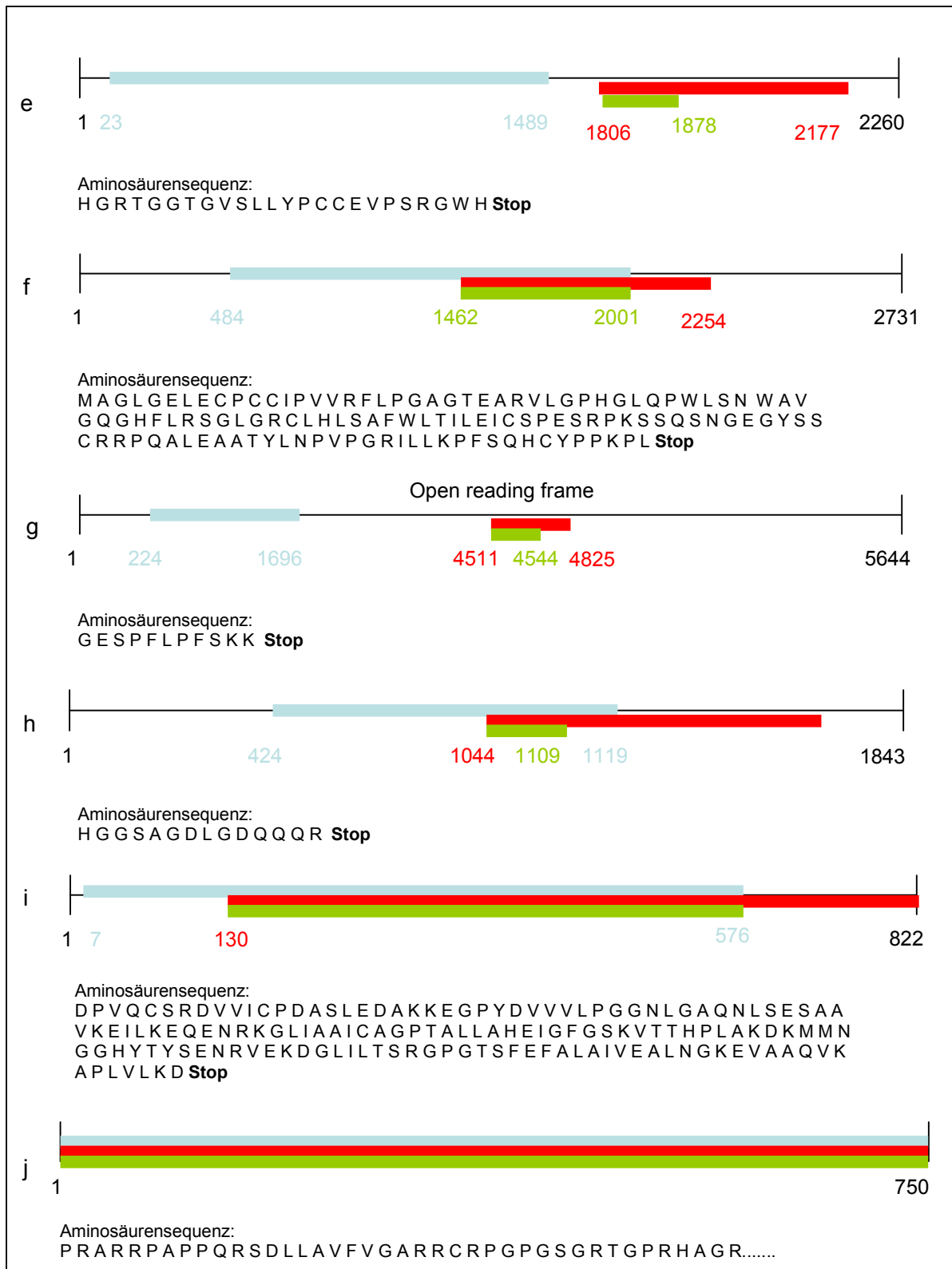


Abbildung 8e-j: Schematische Darstellung der Blastergebnisse und der entsprechenden Aminosäuresequenzen: e: für Klon 166; f: für Klon 482; g: für Klon 483-1; h: für Klon 483-2; i: für Klon 496; j: für Klon 498.

Ergebnisse

Die genaue Lokalisierung der Sequenzen im Genom zeigt Tabelle 11. Die translatierten Aminosäuresequenzen der Klone finden sich in der Abbildungen 8. Die Tabelle 11 gibt die Informationen dieser Abbildungen tabellarisch wieder (exakte Basenlänge in bp, wenn vorhanden, Stelle des Stoppkodons in der cDNA, Länge des Peptids in Aminosäuren und eine Leserahmenbestimmung). Die Sequenzen in 8c und 8d unterscheiden sich in einer Aminosäure, jedoch entstehen 2 differente Peptide (Tabelle 11)

Tabelle 11: Übersicht der cDNA-Charakterisierung:

Klon	13	16	26	165	166	482	483-1	483-2	496	498
Basenlänge (exakt in bp)	250	1138	2040	371	370	788	314	688	692	750
Stopkodon nach (bp)	90	116	69	nein	72	539	33	65	446	nein
Länge des Peptids (#AS)	30	38	23	123	24	179	11	21	148	250
in/out of frame	n.B.	n.B.	out	out	out	in	out	out	in	n.B.

Alle Klone konnten erfolgreich sequenziert und im Genom lokalisiert werden. Die theoretischen Leserahmen wurden erfasst und die Aminosäuresequenzen bestimmt. Nun sollen diese Parameter durch Ermittlung der jeweiligen Translationsprodukte bestätigt werden.

4.4. Induktion der Hefeklone

Die Oberflächenpräsentation muss vor der Reihenuntersuchung sichergestellt werden, um falsch negative Ergebnisse zu verhindern (siehe Methoden 3.6.). Die Negativ- ebenso wie die Positivkontrollen und die Induktionsprüfungen wurden am FACS erfasst.

Datenerfassung am FACS: Mehrere Negativ- und Positivkontrollen sind bei jeder Färbung zur Qualitätssicherung der Ergebnisse erforderlich. Jede Färbekomponente soll einzeln und in Kombination auf die induzierten Hefen erfasst werden.

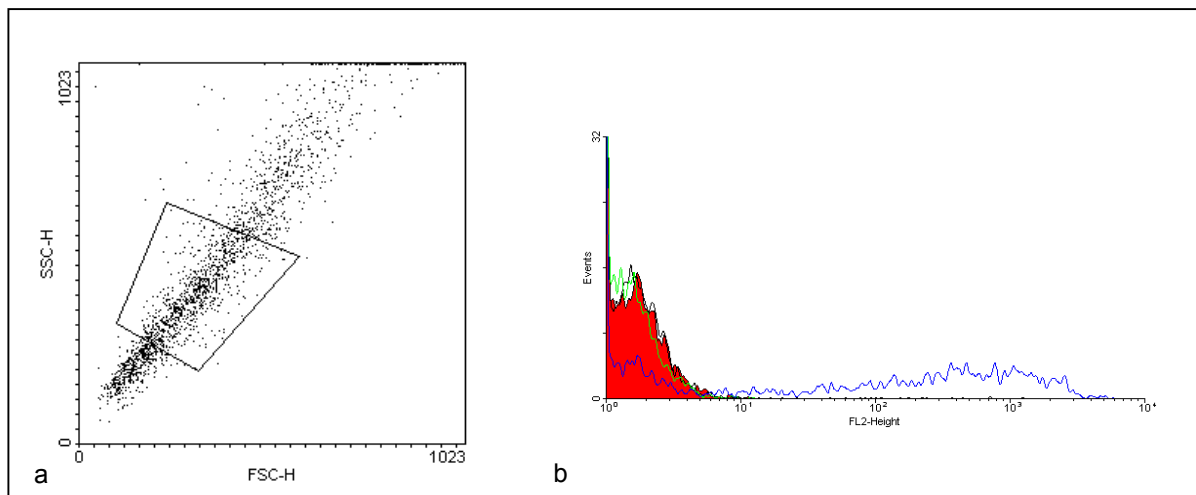


Abbildung 9: Exemplarische Darstellung der Verteilung der Hefepopulationen im SSC und FSC Detektor Dotplot (a), sowie histogrammische Darstellung der gegateten Hefepopulation im Fluoreszenz 2-Kanal (b). a: Die Abszisse gibt den FSC-H und die Ordinate den SSC-H wieder. In diesem System umfasst das Gate die Zielpopulation. b: Die Abszisse gibt die FL2-Height (Fluoreszenzstärke) und die Ordinate die Anzahl an Ereignissen (Events) wieder. In rot: Induzierte Hefe mit sekundärem Färbesystem (anti mouse Fc γ specific Antibody und Phycoerythrin Streptavidin); In grün: Komplette Induktionsfärbung der nicht induzierte Hefe (anti Xpress Antibody, anti mouse Fc γ specific Antibody und Phycoerythrin Streptavidin); In blau: Komplette Induktionsfärbung der induzierten Hefe.

Abbildung 9 zeigt exemplarisch die Färbung einer induzierten pYD1-transformierten Hefe. Das Gate für die Zielpopulation wird entsprechend den Angaben unter 3.6.4. festgelegt. Die rote Kurve und die grüne Kurve sind die Negativkontrollen. Die blaue Kurve zeigt die Färbung der induzierten Hefe mit dem kompletten Färbesystem. Dies ist die Positivkontrolle der Induktionsfärbungen. Nur die induzierten Hefen mit komplettem Färbesystem gefärbt, zeigen eine deutliche Rechtsverteilung (histographisches Charakteristikum der Induktion) der induzierten Hefepopulation. Die Hefeklone können nach diesem Protokoll auf Induktion überprüft werden.

Induktionsprüfung: Die Induktionsprüfung dient dem Nachweis der Oberflächenexpression der Vektorprodukte. Als Negativkontrolle wurde eine Probe der jeweiligen Hefeklone vor dem Induktionsvorgang (hier in schwarz) genutzt.

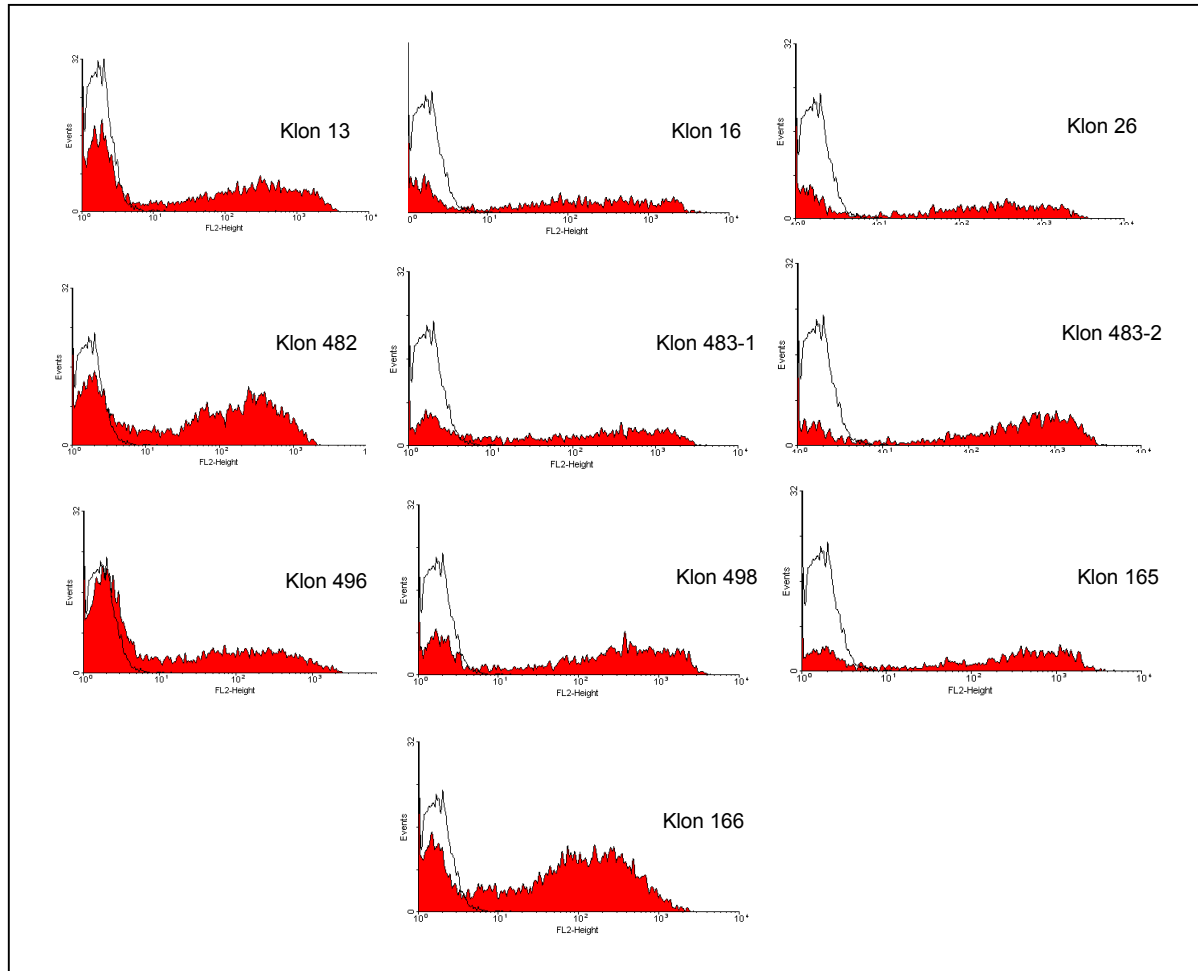


Abbildung 10: Histogramme der Induktionsfärbungen der Klone 13, 16, 26, 482, 483-1, 483-2, 496, 498, 165 und 166. Die Abszisse gibt die Verteilung der Fluoreszenzstärken der Hefepopulation (FL2-H) und die Ordinate die Anzahl an Ereignissen (Events). In schwarz: Induktionsfärbung der nicht induzierten Hefe; In rot: Induktionsfärbung der induzierten Hefe.

Alle in Abbildung 10 dargestellten Verteilungen der Hefepopulationen zeigen eine deutliche Rechtsverlagerung der Hefepopulationen auf der Fluoreszenz 2-Achse im Vergleich zur nicht induzierten Population (schwarz). Immunzytochemisch sind die Klone induziert. Alle Hefeklone sind induziert und können im Western-Blot untersucht werden.

4.5. Translationsnachweis der Inserts

Der Translationsnachweis dient der Erfassung des tatsächlichen Molekulargewichts der Peptide. Weiterhin dient es der Bestätigung der Sequenzanalysen. Unbedingt erforderlich zur Oberflächenexpression der Produkte ist eine effektive Induktion der Hefen. Der Transkriptionsnachweis erfolgte im Western-Blot.

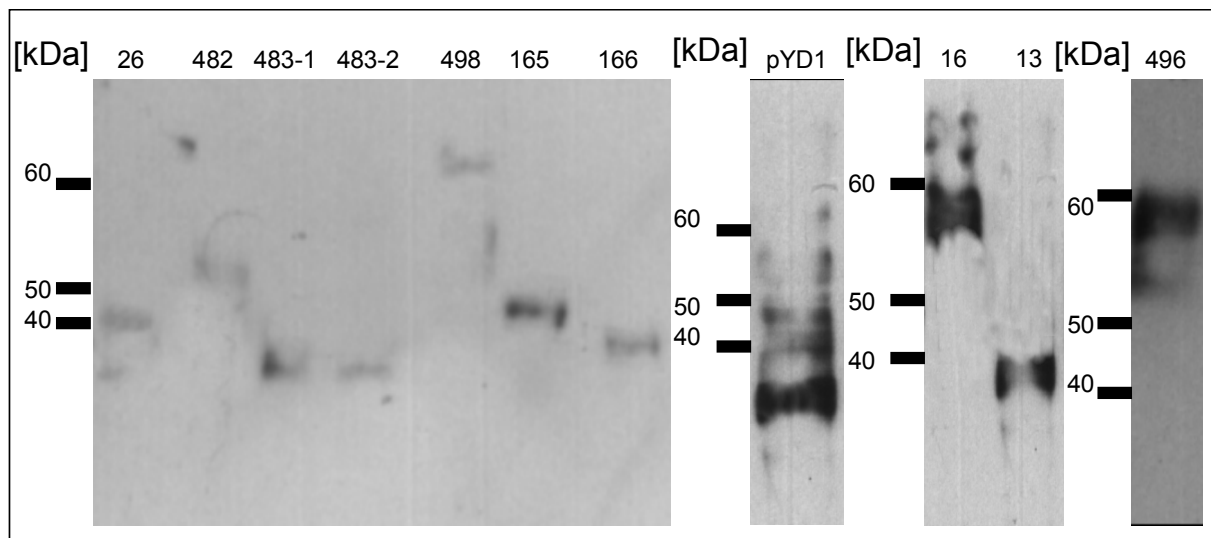


Abbildung 11: Auftrennung der Hefeoberflächenproteine im Western Blot: pYD1, 26, 482, 483-1, 483-2, 498, 165, 166, 496, 16, 13.

Bei der Auswertung dieser Proteinauftrennung ist der Größe des Aga2p-Proteins Rechnung zu tragen (32kDa, Cappellaro et al., 1991). Dies ist dem ermittelten Molekulargewicht abzuziehen, um die tatsächliche Größe zu ermitteln. Es ergeben sich somit für die jeweiligen transkribierten Klone folgende Molekulargewichte:

Tabelle 12: Übersicht der theoretischen und der ermittelten Molekulargewichte:

Klon	pYD1	13	16	26	482	483-1	483-2	496	498	165	166
theoretisches MW (kDa)	32	3	20,7	2	21,78	1,236	1,425	21	30	13,6	2,569
ermitteltes MW (kDa)	35	3	20	2	22	2	2	20	25	10	3

Wie in Tabelle 12 ersichtlich, stimmen die im Western Blot ermittelten Proteingewichte, mit den theoretisch errechneten Gewichten überein und wurden anschließend der serologischen Reihenuntersuchung unterzogen.

4.6. Serologische Aufarbeitung

Das Ziel war der immunzytometrische Nachweis von Antikörpern gegen auf der Oberfläche von Hefen exprimierten cDNA-Produkten. Diese Antikörper implizieren eine Reaktion des Immunsystems auf diese Antigene. Diese Klone sind somit „autoreaktiv“, sie lösen eine Immunreaktion gegen das „Selbst“ aus. Um die Zahl irrelevanter, nicht cDNA-Produkt spezifischer Antikörper zu minimieren, wurden die Seren mit induzierten pYD1 Leerhefen präabsorbiert. Bei jeder Färbung wurden Positivkontrollen aus Vordaten der Arbeitsgruppe mitgeführt. Der Serenpool von 99 Pankreaskarzinompatienten, 63 gesunden Spendern und 14 Pankreatitispatienten wurde auf autoreaktive Antikörper untersucht. Zur weiteren Bestätigung der Ergebnisse wurden die autoreaktiven Seren in Verdünnungsreihen wiederholt gefärbt.

Präabsorption der Seren: Die Präabsorption der Seren dient der Elimination unspezifischer Antikörper. Unabdingbar ist die gesicherte Induktion der pYD1-Leerhefe, die für diesen Vorgang genutzt wird (Abbildung 12).

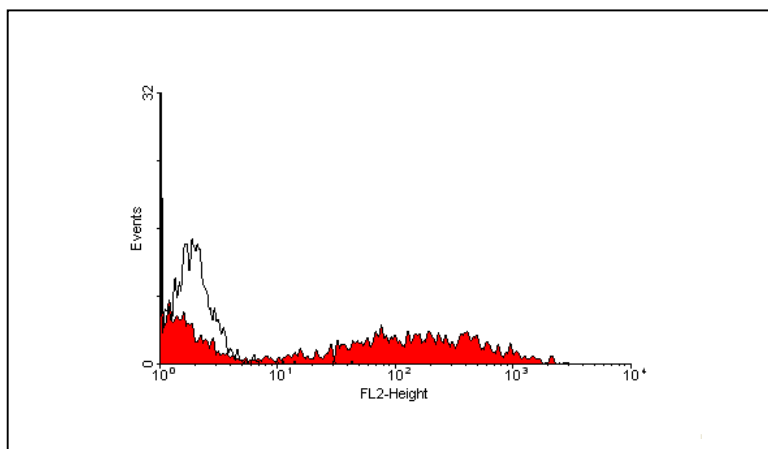


Abbildung 12: Histogramm der Induktionsfärbung der pYD1-Leerhefen. Die Abszisse gibt die Verteilung der Fluoreszenzstärken der Hefepopulation (FL2-H) und die Ordinate die Anzahl an Ereignissen (Events). In schwarz: Induktionsfärbung der nicht induzierten pYD1-Leerhefe Hefe; in rot: Induktionsfärbung der induzierten pYD1-Leerhefe.

Die Hefepopulation des Histogramms der Abbildung 12 weist im Vergleich zur nicht induzierten pYD1-Leerhefe, eine deutliche Rechtsverlagerung der Hefepopulation auf. Die pYD1 Leerhefen gelten somit als induziert. Die Seren wurden mit diesen Hefen präabsorbiert. Die präabsorbierten Seren konnten für immunzytometrische Färbungen genutzt werden.

Serologische Reihenuntersuchung der cDNA-Hefeklone: Die Färbung der Seren dient dem Nachweis von Reaktivitäten auf die Hefeklone. Jedes Serum wurde mit jedem Klon gefärbt. Zur Auswertung wurde für jede Färbung der Quotient aus der mittleren Fluoreszenzstärke eines Klons und der mittleren Fluoreszenzstärke von pYD1, je mit demselben Serum gefärbt, gebildet. Dieser Quotient (mean fluorescence Ratio) dient der Subtraktion der Hintergrundfluoreszenzstärke der Hefen. Der Hintergrund ist jeweils durch die Fluoreszenzstärke von pYD1 gegeben. Als reaktiv gelten die Seren, welche eine Fluoreszenzstärke (als Quotient) erzeugen, die größer ist als Mittelwert + 2x Standardabweichung der Fluoreszenzstärken der Färbungen der Seren der gesunden Kontrollgruppe auf die Hefeklone (Gaudernack et al., 2004). Die Färbungen wurden reproduziert und durch entsprechende Kontrollen abgesichert (Beispiel Abbildung 13).

Gütekriterien der serologischen Reihenuntersuchung: Um die Ergebnisse der serologischen Reihenuntersuchungen zu sichern, wurden Positivkontrollen durchgeführt. Ausgesuchte Klone und Seren aus vorherigen, gesicherten Ergebnissen der Arbeitsgruppe dienten als Positivkontrollen. Diese Färbekombinationen (Wadle et al., 2006) wurden, unabhängig von dieser Arbeit, bereits mehrfach verifiziert. Diese konnten daher als Positivitätsstandard verwendet werden.

Das Serum 10 wurde auf dem Hefeklon SCP1 1-2, das Serum 25 auf Klon SCP1 2, die Seren 29, 32, 33 und 40 auf Klon SCP1 2-3 gefärbt. Die Abbildung 13 zeigt beispielhaft die Färbung des Serums 32 auf SCP1 2-3.

Ergebnisse

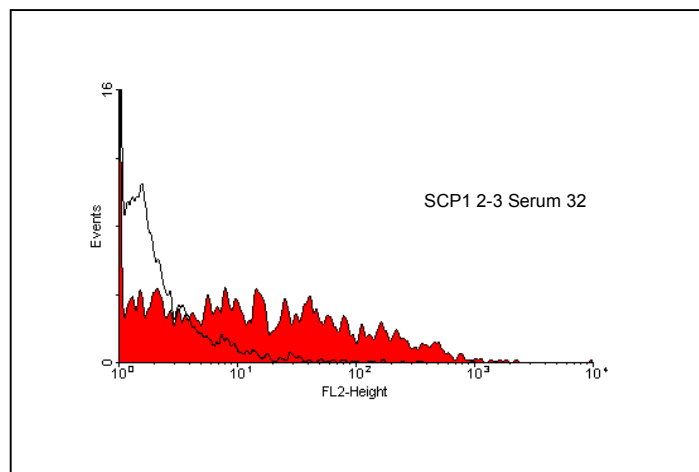


Abbildung 13: Histogramm der Färbung des Serum 32 auf Klon SCP1 2-3. Die Abszisse gibt die Verteilung der Fluoreszenzstärken der Hefepopulation (FL2-H) und die Ordinate die Anzahl an Ereignissen (Events). In schwarz: Fluoreszenzfärbung der pYD1 Leerhefe mit dem Serum 32 und dem Färbesystem ; In rot: Fluoreszenzfärbung des Klones SCP1 2-3 mit dem Serum 32 und dem Färbesystem.

Die in Abbildung 13 dargestellte Färbekonstellation weist eine deutliche Rechtsverschiebung der Hefepopulationen bei Färbung mit entsprechendem Serum im Vergleich zur Kontrollfärbung einer induzierten pYD1 Leerhefe auf. Die weiteren oben angeführten Färbekonstellationen wiesen ein ähnliches Verhalten im FACS auf. Die Sensitivität dieser Färbung ist somit gegeben. Die Spezifität ist durch die Negativkontrollfärbung gegeben. Diese Kontrollen wurden bei den serologischen Reihenuntersuchungen stets mitgeführt.

Serologische Reihenuntersuchung der selektierten Hefeklone: Die serologische Reihenuntersuchung dient der Erfassung von Autoreaktivitäten gegen die präsentierten cDNA-Translate. Zunächst wurde eine serologische Untersuchung nur mit Pankreaskarzinompatientenseren durchgeführt, um die Reaktivität abzuschätzen. Die Klone 13 und 16 wiesen bei diesem Schritt keinerlei Reaktivität auf, bei positivem Ausschlag der Kontrollen (Abbildung 14).

Ergebnisse

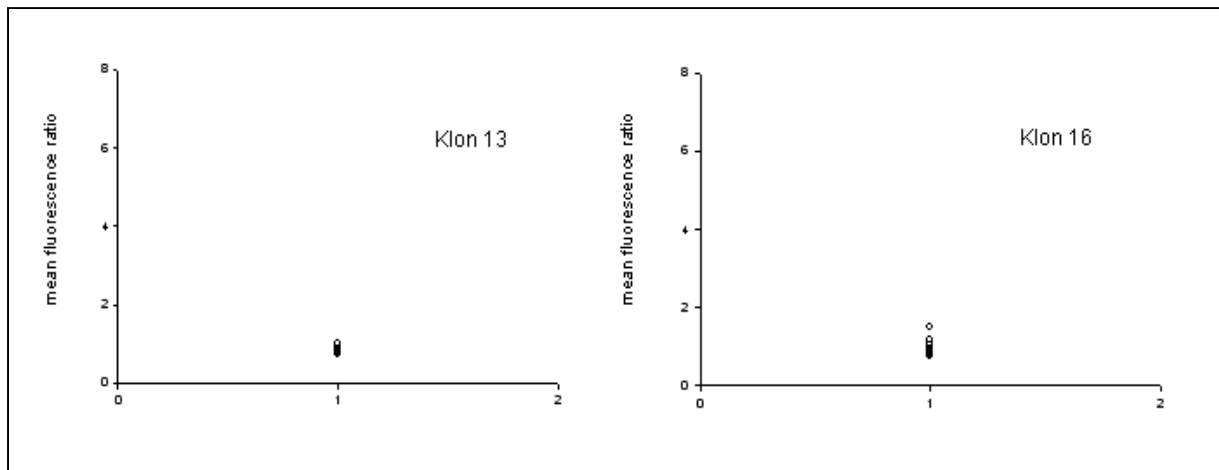


Abbildung 14: Dotplotdarstellungen der Quotienten der mittleren Fluoreszenzstärken der Färbungen der Pankreaskarzinompatientenseren auf die Klone 13 und 16. Abszisse: Darstellungen der mean fluorescence Ratio der Einzelfärbungen der jeweiligen Klone mit den Seren der Pankreaskarzinompatienten. Ordinate: Quotient der mittleren Fluoreszenzstärken des gefärbten Hefeklons und der pYD1 Leerhefe mit selbem Serum (mean fluorescence Ratio).

Wie in Abbildung 14 ersichtlich, zeigen die Pankreaskarzinomseren keine Reaktivität für die Klone 13 und 16. Die mean fluorescence Ratio liegt bei etwa eins, also dem Hintergrund entsprechend. Auf eine weitere serologische Bearbeitung wurde bei diesen Klonen verzichtet.

Alle anderen Klone wurden wiederholt mit Seren der Pankreaskarzinompatienten und Kontrollseren gefärbt. Die Abbildung 15 zeigt die Reaktivitäten der einzelnen Serengruppen auf die jeweiligen Klone. Ergänzend zeigt Tabelle 13 den prozentualen Anteil und die absolute Menge der Reaktivitäten.

Ergebnisse

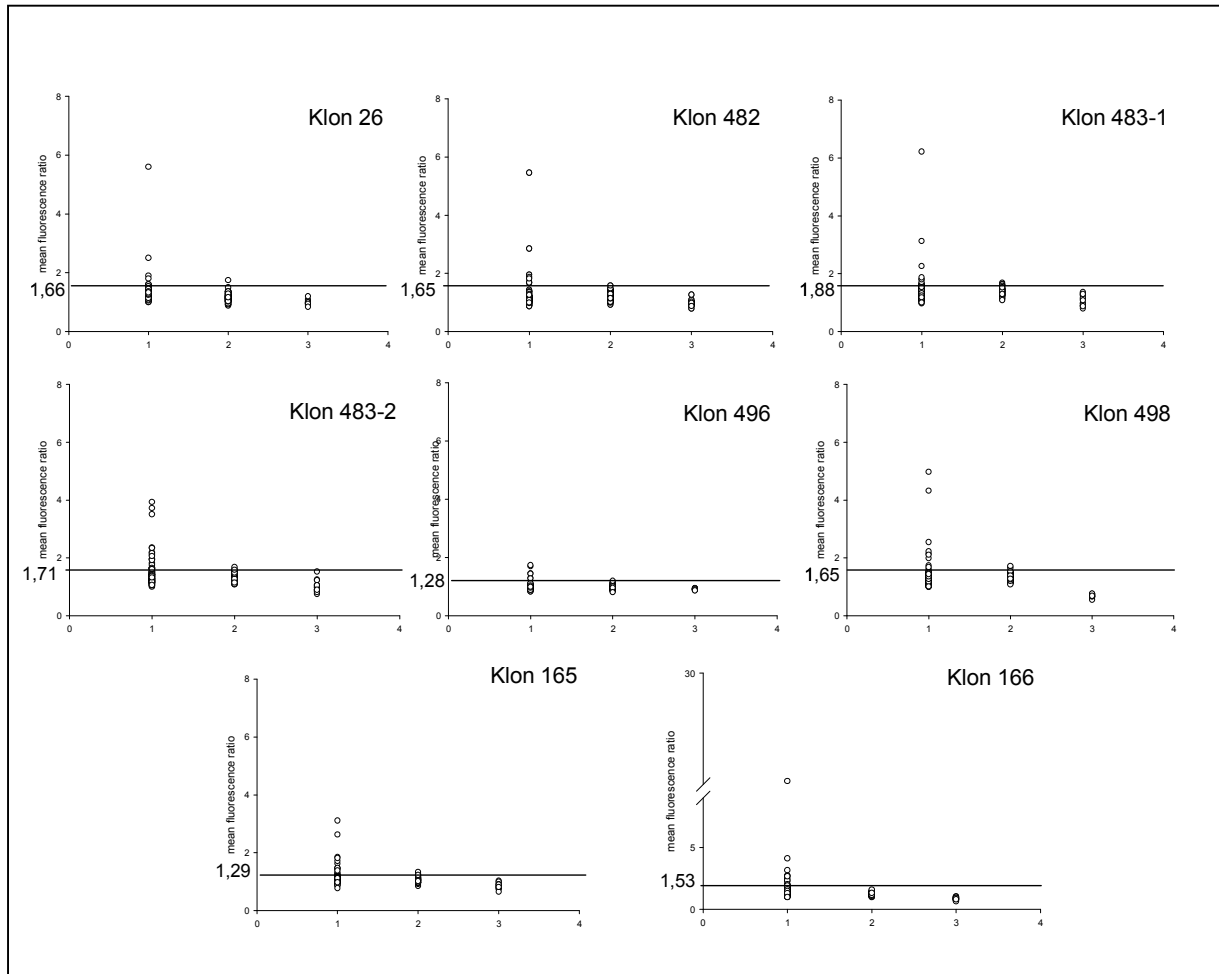


Abbildung 15: Dotplotdarstellungen der Quotienten der mittleren Fluoreszenzstärken der Färbungen der Pankreaskarzinompatientenserum und ihrer Kontrollen auf die Klone 26, 482, 483-1, 483-2, 496, 498, 165 und 166. Abszisse: 1: Darstellungen der mean fluorescence Ratio der Einzelfärbungen der jeweiligen Klone mit den Seren der Pankreaskarzinompatienten. 2: Darstellungen der mean fluorescence Ratio der Einzelfärbungen der jeweiligen Klone mit den Seren der gesunden Spender. 3: Darstellungen der mean fluorescence Ratio der Einzelfärbungen der Seren der Pankreatitispatienten. Ordinate: Quotient der mittleren Fluoreszenzstärken des gefärbten Hefeklons und der pYD1 Leerhefe mit selbem Serum (mean fluorescence Ratio).

Die Dotplotdarstellungen in Abbildung 15 zeigen die Reaktivitäten der Serengruppen auf die einzelnen Klone. Die Reaktivitäten (Ratio-Werte) sind als Plots (Kreise) angezeigt. Die Grenze der Positivität wurde analog zur oben genannten Formel (Mittelwert + 2x Standardabweichung) für jede Serologie berechnet (Cut off-Wert, Tabelle 13). Die Tabelle 13 gibt den prozentualen Anteil und die absolute Menge der Reaktivitäten auf die Klone wieder.

Tabelle 13: Übersicht der prozentualen und quantitativen Reaktivitäten auf die einzelnen untersuchten Klone.

Klon	26	482	483-1	483-2	496	498	165	166
Cut off-Wert der Positivität	1,66	1,65	1,88	1,71	1,28	1,65	1,29	1,53
Prozentualer Anteil (in Prozent der reaktiven Tumorseren)	4,2	6,2	4,2	12,4	6,2	8,2	10,3	29,9
Absolute Menge (Anzahl an reaktiven Tumorseren)	4	6	4	12	6	8	10	30
Prozentualer Anteil (in Prozent der reaktiven gesunden Spenderseren)	1,6	1,6	0	0	0	1,6	0	1,6
Absolute Menge (Anzahl an reaktiven gesunden Spenderseren)	1	1	0	0	0	1	0	1
Prozentualer Anteil (in Prozent der reaktiven Pankreatitispatientenseren)	0	0	0	0	0	0	0	0
Absolute Menge (Anzahl an reaktiven Pankreatitispatientenseren)	0	0	0	0	0	0	0	0

Die serologische Reihenuntersuchung ergab keinerlei Autoreaktivitäten für die Klone 13 und 16. Gegen Klon 26 und Klon 483-1 fanden sich in 4,2 % der Pankreaskarzinompatientenseren Antikörper. 6,2% der Patienten wiesen Reaktivitäten für Klon 482 und für Klon 496, 12,5% für Klon 483-2, 8,2% für Klon 498, 10% für Klon 165 und 29,9% für Klon 166 auf. Die Normalseren blieben nur wenig reaktiv (höchstens 1,6%). Keines der Pankreatitisseren reagierte auf die untersuchten Klone. Reaktive Seren sollten durch eine Serumverdünnung, bzgl. ihrer Reaktionsstärke analysiert werden.

Verdünnungsreihe der positiven Seren: Die reaktiven Seren wurden wie folgt, in den Schritten $1:10^2$, $1:10^3$, $1:10^4$, $1:10^5$, $1:10^6$ und $1:10^7$ (jeweils im Verhältnis Serum zu PBS) verdünnt und auf serologische Reaktivität für die ausgewählten cDNA-Hefeklonen untersucht. Dargestellt sind die Titrationen des jeweils reaktivsten Serums (siehe Abbildung 16). Die übrigen Seren ließen sich in

Ergebnisse

ähnlicher Weise titrieren. Dargestellt ist jeweils die mean fluorescence Differenz der Titration des entsprechenden Serums (Hintergrundleuchten der pYD1 Leerhefe ist bereits abgezogen) auf dem jeweiligen Hefeklon.

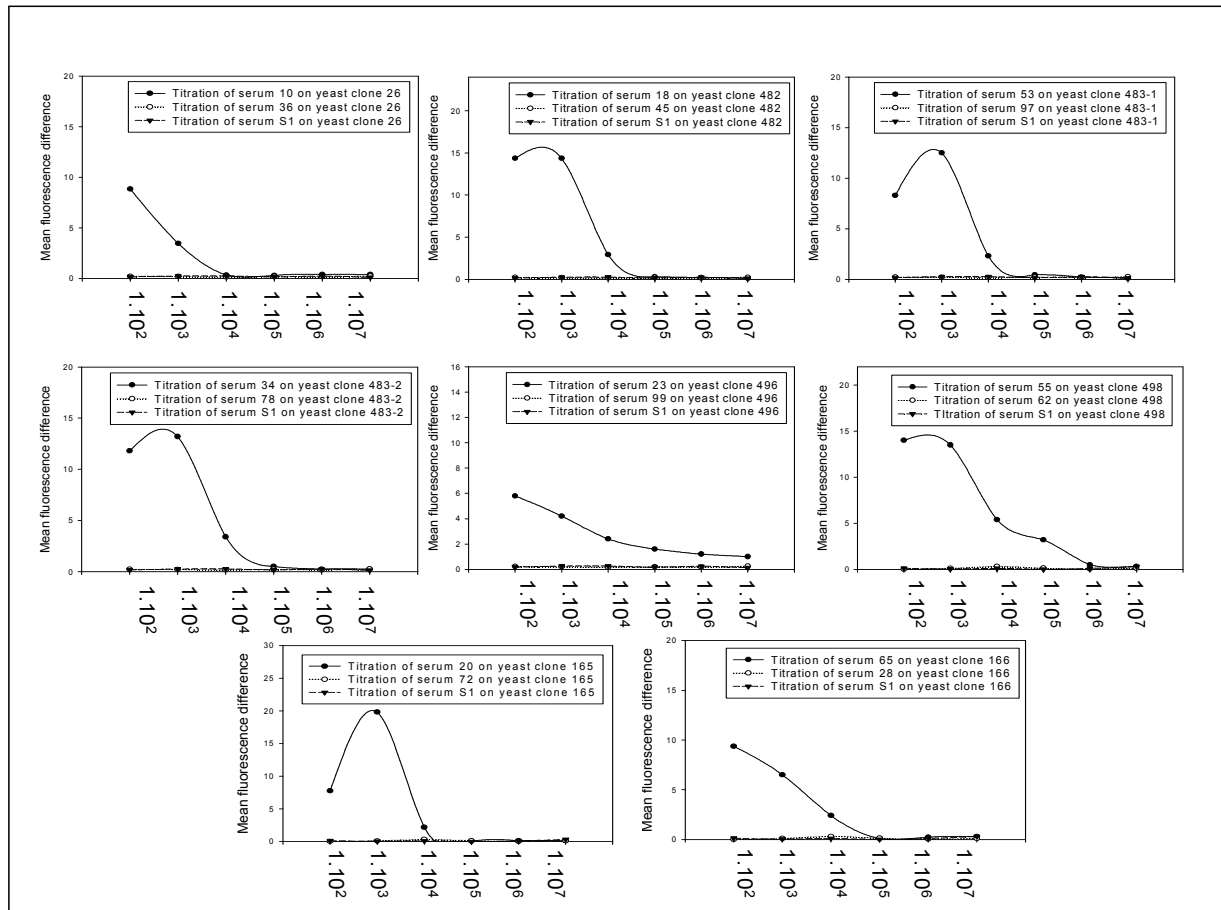


Abbildung 16: Grafische Darstellung der mean fluorescence Differenzen zwischen mittleren Fluoreszenzstärken auf dem jeweiligen Hefeklon und Hintergrund-pYD1-Leuchten. Die Abszisse gibt die Verdünnungstufen der Seren wieder, $1:10^2$; $1:10^3$; $1:10^4$; $1:10^5$; $1:10^6$ und $1:10^7$. Die Ordinate stellt die Differenz der mittleren Fluoreszenzstärken zwischen der Färbung der Zielhefe und der der pYD1 Leerhefe mit selbstem Serum dar. Zu ersen sind jeweils die Färbung des Tumorsersums auf dem Hefeklon; die Färbung eines negativen Normalserums (S1) und die Färbung eines negativen Tumorsersums. Folgende Färbekonstellationen sind dargestellt: Klon 26, Serum 10, Klon 482, Serum 18; Klon 483-1, Serum 53, Klon 483-2, Serum 34; Klon 496, Serum 23; Klon 498, Serum 55; Klon 165, Serum 20 und Klon 166, Serum 65.

Die Abbildung 16 macht deutlich, dass die am stärksten reaktiven Seren eine titrierbare Reaktivität aufweisen. Die Färbekonstellationen Klon 482, Serum 18, Klon 483-1, Serum 53, Klon 165, Serum 20, und Klon 498, Serum 55 weisen alle eine so genannte sterische Inhibition auf. Dies bedeutet, dass im Verdünnungsbereich $1:10^2$, der Antikörpertiter so hoch ist, dass diese sich gegenseitig an der Bindung hindern. Bei weiterer Verdünnung ($1:10^3$) verschwindet dieser Effekt und die Bindung an das Target-Antigen ist maximal. Im weiteren Verlauf fällt die mittlere

Ergebnisse

Fluoreszenzstärke entsprechend der Verdünnung des Serums. Die übrigen Färbekonstellationen (Klon 26, Serum 10, Klon 483-2, Serum 34, Klon 496, Serum 23, und Klon 166, Serum 65) weisen einen Abfall ihrer Fluoreszenzstärke entsprechend der Verdünnung des Serums auf. In allen Fällen bleiben beide Kontrollseren strikt nicht reaktiv und nicht titrierbar. Die übrigen reaktiven Seren weisen ein ähnliches Verhalten auf. Die Autoreaktivitäten der Seren konnten durch Verdünnungsreihen bestätigt werden. Diese Autoreaktivitäten sollen nun mit den pathoanatomischen Befunden der Patienten abgeglichen werden.

4.7. Statistische Bearbeitung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse der serologischen Reihenuntersuchung dient der Suche nach Korrelationen zwischen Reaktivitäten und klinisch-pathologischen Befunden. Die Ergebnisse der serologischen Reihenuntersuchungen wurden binominal kodiert: Der Positivität wurde je Aussage 1 (ja) bzw. 2 (nein) zugeteilt. Die Daten der Patienten sind ebenfalls in binominaler Form kodiert worden: Über oder unter 60, Geschlecht, postoperativer Lymphknotenstatus (pN), Metastasen, Staging (Stadium 1, 2 = 1; 3, 4 = 2) und Tumorstadium (1, 2 = 1; 3, 4 = 2). Diese Daten wurden für jeden Klon mit der Positivität hinsichtlich einer eventuellen Korrelation untersucht. Dies erfolgte dank eines mit SPSS 13.0 durchgeführten Chi-Quadrat Tests. Klone mit fehlender Reaktivität wurden ausgelassen. Die Übersicht der erzielten p-Werte wird in der Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14: Darstellung der Ergebnisse der durchgeführten Chi Quadrat Teste (p-Werte):

Klone	26	482	483-1	483-2	496	498	165	166
über 60	0,777	0,832	0,203	0,832	0,451	0,931	0,785	0,478
Geschlecht	0,567	0,789	0,492	0,789	0,254	0,779	0,322	0,065
pN	0,893	0,923	0,249	0,234	0,603	0,234	0,526	0,173
Metastasen	0,999	0,684	0,512	0,683	0,341	0,263	0,407	0,407
Staging binominal	0,789	0,837	0,778	0,294	0,989	0,217	0,906	0,871
Tumorstadium binominal	0,654	0,373	0,424	0,241	0,605	0,241	0,829	0,182

Die Wahrscheinlichkeit einer Korrelation steigt mit der Anzahl der durchgeführten Tests. Daher muss ein Korrekturfaktor eingeführt werden. Bei einem einzigen Chi Quadrat Test gilt das Ergebnis als signifikant, wenn $p \leq 0,05$ ist. In dieser Arbeit wurde die Positivität mit 6 verschiedenen Parametern verglichen, der p-Wert muss also entsprechend des Korrekturfaktors kleiner $0,05:6$ sein. Wie aus Tabelle 14 ersichtlich sind alle p-Werte größer als der hier angeführte Mindestwert. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse korrelieren somit nicht mit den klinisch/pathologischen Befunden der Patienten. Daraufhin wurden die potentesten Klone (bzgl. ihrer Autoreaktivität :26, 483-2, 496, 165 und 166) auf immunogene Epitope untersucht.

4.8. Epitop-Vorhersagen

Die Epitop-Vorhersage dient der Abschätzung der theoretischen Immunogenität eines Klons. Die Klone 26, 483-2, 496, 165 und 166 wurden mit der SYFPEITHI-Online Prädiktionssoftware untersucht (Rammensee et al., 1999). Da dieser Vorgang eine Abschätzung potentieller MHC-Epitope in deren Sequenzen erlaubt, können hypothetische Rückschlüsse auf deren Immunogenität gezogen werden. Insbesondere wurde nach MHC-Klasse II Epitopen gesucht. Diese spielen eine wichtige Rolle in der Präsentation von Antigenen für B-Zellen.

Tabelle 15: Darstellung der höchsten SYFPEITHI Scores für die einzelnen Peptide und die dazugehörigen HLA Moleküle:

Klon	26	165	166	483-2	496
SYFPEITHI Score for MHC-calls II	22 (HLA DRB1*0101)	32 (HLA DRB1*0101)	23 (HLA DRB1*0101)	nicht bestimmbar	33 (HLA DRB1*0101)

Die Tabelle 15 zeigt exemplarisch die höchsten SYFPEITHI Scores für die Klone 26, 165, 166, 483-2 und 496. Auf die MHC-Klasse II Epitope bezogen, erscheinen die Klone 165 und 496 als besonders potent (hohe Scores über 25, durch Rammensee et al., 1999 als besonders wahrscheinlich angegeben). Dies weist daraufhin, dass diese Epitope, mit guter Wahrscheinlichkeit, eine B-Zell Antwort stimulieren können. Dennoch stellt dieser theoretische Wert nicht das entscheidende Kriterium für die Weiterverarbeitung dar. Eine wesentlichere Rolle spielen die Autoreaktivitäten und die Vordaten zu den einzelnen Klonen. In Anbetracht dieser Kriterien sollen die potentesten Klone (Klon 165 und 166), mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern –isoliert aus Phage-display-Banken- weitergehend analysiert werden.

4.9. Isolation von spezifischen Fab-Antikörpern für die selektierten und charakterisierten Pankreas-cDNA-Hefe-Peptide

Die serologischen Reihenuntersuchungen haben hinsichtlich ihrer serologischen Reaktivität einige potentiell interessante Antigene hervorgebracht. Insbesondere fallen die Klone 165 und 166 auf, mit Reaktivitäten von respektive 10% und 29,9%. Das Ziel der weiteren Untersuchung ist der Nachweis der Existenz dieser Peptide in Tumorzelllinien. Dazu sollen Peptid-spezifische Fab-Antikörper dienen. Die Phage-display-Technologie (Hoogenboom et al., 1997) erlaubt es, aus einem naiven humanen Fab-Repertoire, selektive Antikörper gegen Zielpeptide zu selektionieren.

Zunächst sollen die Klone als Peptide zur Selektion synthetisiert werden. Um diese Peptide zur Selektion nutzen zu können, muss sichergestellt werden, dass Patientenantikörper sowohl die synthetischen als auch die Hefepptide erkennen. Anschließend können auf diese Peptide spezifische Fab-Antikörper selektioniert werden. Diese Antikörper-Klone müssen zur weiteren Analyse charakterisiert werden (Epitopspezifität, Restriktionsfragmentenpolymorphismus). Schließlich werden die Fab-Antikörper auf Hefebindung überprüft.

Synthese der Target-Peptide: Die Firma „Peptides and Elephants“ wurde mit der Synthese der Peptide beauftragt. Diese sollten N-terminal biotinyliert sein. Die bestellte Menge betrug etwa 2 mg pro Peptid. Aus Kostengründen wurden die jeweiligen Klone in einige überlappende Fragmente gestückelt:

Fragmente des Klons 165, in Klammern deren Bezeichnung:

M A G L G E L C P C C I P V (G3)
V V R F L P G A G T E A R V L (H3)
G P H G L Q P W L S N W A V G (A4)
G Q G H F L R S G L G R C L H (B4)
L S A F W L T I L E I C S P E (C4)
R R P Q A L E A A T Y L N P V (D4)
Y L N P V P G R I L L K P F S (E4)
L L K P F S Q H C Y P P K P L (F4)

Fragmente des Klons 166, in Klammern deren Bezeichnung:

H G R T G G T G V S L L Y P C (E3)

V S L L Y P C C E V P S R G W (F3)

Diese Sequenzen sind zum Teil überlappend (V S L L Y P C), um einen Epitopverlust im Vergleich zum Gesamtpeptid zu minimieren. Diese synthetisierten Peptide sind biotinyliert. Zunächst sollen autoreaktive Seren aus der Serologie auf Antikörper gegen diese Peptidfragmente untersucht werden.

Serologische Reaktivität auf synthetische Peptide und den auf der Hefe exprimierten cDNA-Fragmenten (Kreuzuntersuchung): Die serologische Kreuzuntersuchung diente dem Abgleich der Reaktivität der Seren für die Hefekclone und für die korrespondierenden synthetischen Peptide. Einige Seren, welche Autoreaktivitäten auf Klon 165 und 166 (Pankreaskarzinompatientenseren) aufwiesen, wurden auf Reaktivität gegen die synthetisierten Peptide untersucht. Die in der FACS-Färbung reaktivsten Seren wurden auf den einzelnen Peptidfragmenten im ELISA getestet. Abbildung 17 zeigt exemplarisch das Verhalten dieser Seren im ELISA und im FACS. Das Peptid C2 ist ein irrelevantes Kontrollpeptid.

Ergebnisse

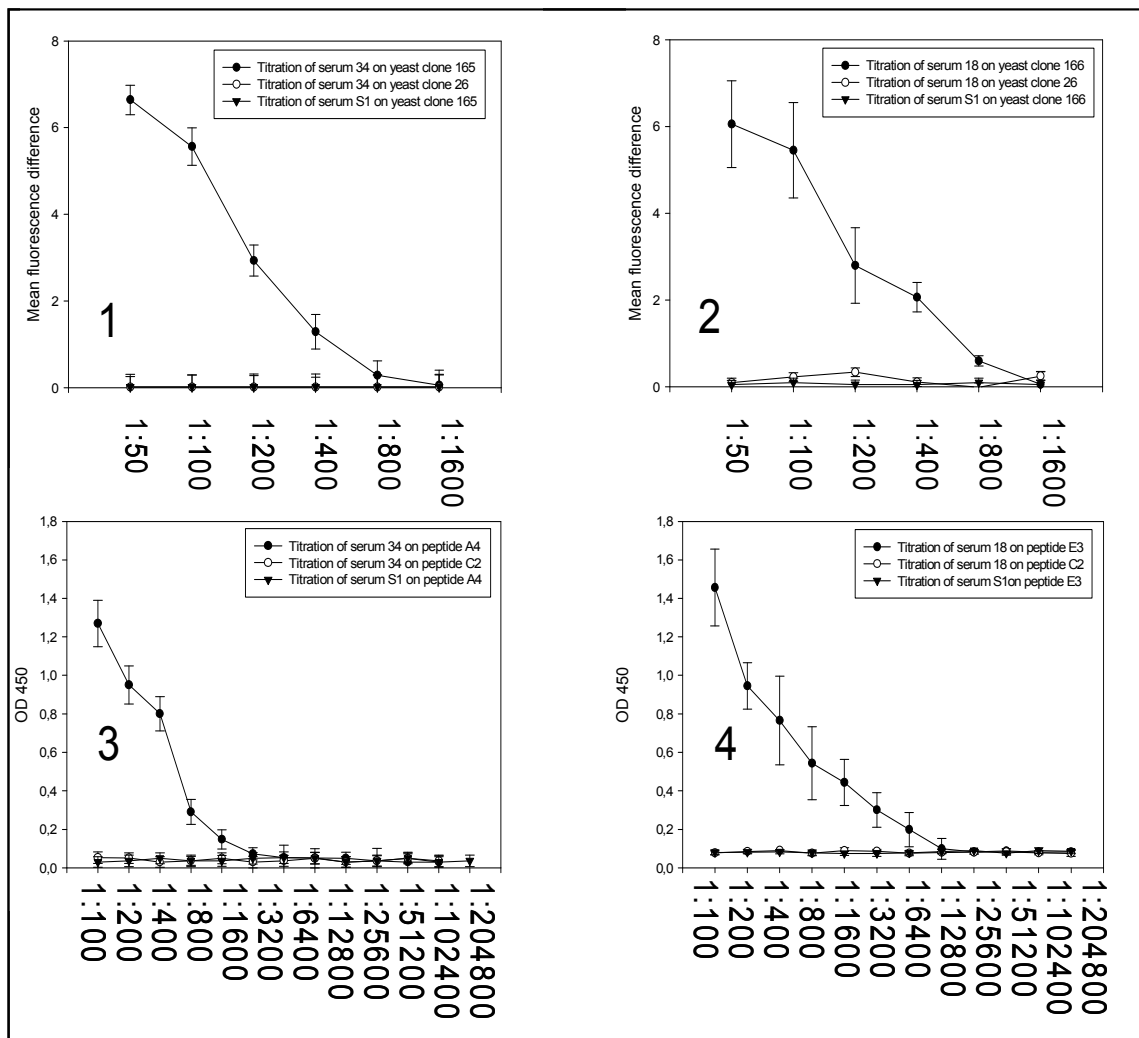


Abbildung 17: Grafische Darstellungen der Titrations folgender Färbekontstellationen: Serum 34 auf Hefeklon 165 (1) und Peptid A4 (Fragment Protein 165) (3), Serum 18 auf Hefeklon 166 (2) und Peptid E3 (Fragment Peptid 166) (4). Die Abszisse gibt für die FACS Färbungen (1 und 2) die genutzten Verdünnungen der Seren: 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 und 1:1600 (Verhältnis Serum zu PBS) sowie für die Serenverdünnungen für die ELISA (3 und 4): 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400, 1:12800, 1:25600, 1:51200, 1:102400, 1:204800. Die Ordinate gibt die mittlere Fluoreszenzstärke (mean fluorescence) an (abzüglich der pYD1 Fluoreszenzstärke bei FACS Daten) oder die optische Dichte (OD) bei 450nm (bei ELISA Daten).

Die Abbildung 17 stellt das Verhalten der jeweiligen Seren im FACS und im ELISA dar. Das Serum 34 ist für den Hefeklon 165 reaktiv (1). Diese Reaktivität des Serums 34 für den Hefeklon 165 ist titrierbar. Dasselbe Serum für Hefeklon 26 (hier als Kontrollhefe) zeigt kaum Abweichungen von der Grundlinie. Das Serum S1 (Serum eines gesunden Spenders, als areaktiv beschrieben) weist keine Reaktivität und kein Titrationsverhalten auf. Im ELISA verhalten sich dieselben Seren in ähnlicher Weise für Peptid A4 (3) (Protein 165 Fragment), respektive C2.

Serum 18 ist reaktiv für den Hefeklon 166 (2). Diese Reaktivität ist titrierbar. Dasselbe Serum zeigt für Hefeklon 165 (hier als Kontrollhefe) kaum Abweichungen von der Grundlinie. Das Serum S1 ist areaktiv und nicht titrierbar. Im ELISA ist die Reaktivität dieser Seren für das Peptid E3 (4) (Peptid 166 Fragment) und für C2 ähnlich. Weitere Seren konnten in gleicher Weise im FACS und im ELISA titriert werden. Weiterhin fanden sich Pankreaskarzinompatientenseren mit Antikörpern gegen das Klon 166 Fragment F3 und gegen das Klon 165 Fragment B4, während die anderen Klon 165 Fragmente keine Reaktivitäten in Patientenseren vorweisen konnten (G3, H3, C4, D4, E4, F4). Diese Fragmente wurden nicht zur Selektion spezifischer Fab-Antikörper genutzt. Es existieren somit im Serum der Patienten Antikörper gegen das auf der Hefeoberfläche exprimierte Peptid, sowie gegen das linearisierte synthetische Peptid (zumindest gegen die Fragmente E3 und F3, respektive A4 und B4). Es ist daher möglich, an Peptidfragmente bindende Fab-Antikörper zu selektionieren und diese für weitere analytische Schritte zu nutzen. Zunächst sollen die Peptide zur Selektion Peptid-spezifischer Phagen genutzt werden.

Testung der potentiellen Binder auf Kreuzreaktivität: Die Testung auf Kreuzreaktivität dient der Erfassung unspezifisch bindender Antikörper. Die Bindungsspezifität wurde mittels ELISA nachgewiesen. Als Positivkontrolle für die Phagenproduktion diente der Phagenklon „F2“, ein aus der Arbeitsgruppe stammender Streptavidinbinder. Jeder Phagenklon wurde sowohl auf das Target-Peptid als auch auf weitere Peptide und auf Streptavidin getestet. Zur Sicherung dieser Ergebnisse wurde jeder Ansatz drei Mal wiederholt.

Ergebnisse

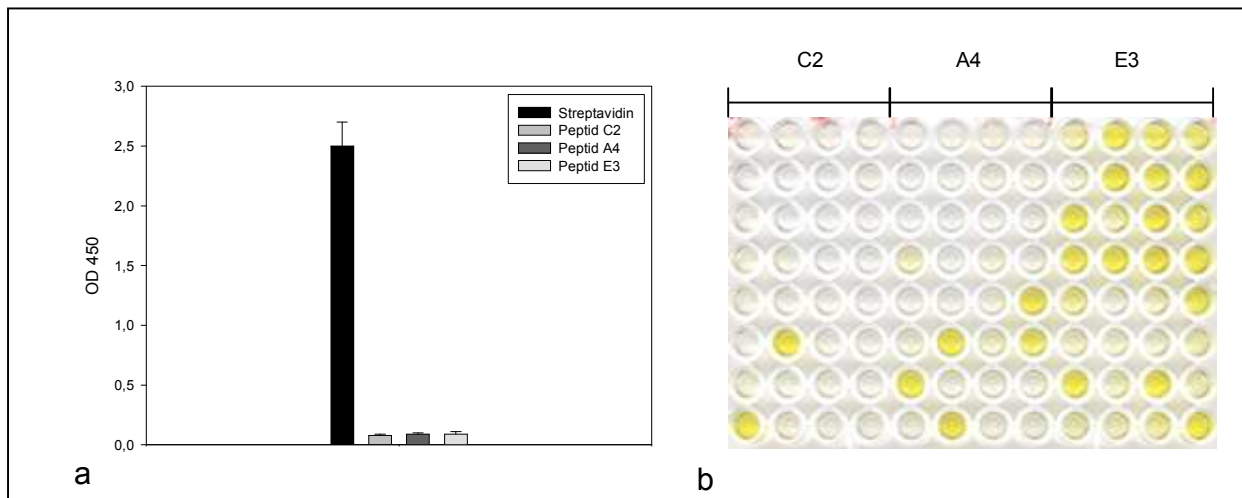


Abbildung 18: Exemplarische Anordnung (Bild b) der Phagenklone auf die Peptide E3 (Klon 166), A4 (Klon 165) und C2 (Kontrollpeptid) im ELISA zur Kreuzreaktivitätstestung, sowie Histogramme (Bild a) der Absorption des Phagen F2 auf Streptavidin und auf die Peptide C2, A4 und E3. Im ELISA gibt die Ordinate die OD bei 450nm wieder.

Die Abbildung 18 zeigt exemplarisch das Ergebnis einer solchen Testung auf Kreuzreaktivität. Dargestellt ist die Bindung des Phagen F2 auf Streptavidin, sowie sein Verhalten auf den jeweiligen Peptiden. Die Bindung äußert sich durch eine wiederholt hohe OD 450 (2,5 im Mittel), dies ist die Positivkontrolle. Dementsprechend liegt die Bindung auf die Kontrollpeptide zwischen 0,08 und 0,1, dies ist die Negativkontrolle.

Phagenklone aus der 3. Selektionsrunde gegen das Peptid E3 (Klon 166) wurden in den vier äußeren rechten Spalten inkubiert (je 1 differenter Phagenklon pro Well). Die gleichen Phagenklone wurden in den mittleren vier Spalten mit Peptid A4 (Klon 165) gecoatet und in den linken vier Spalten (mit Peptid C2 gecoatet) inkubiert. Die Absorption in den einzelnen Wells wurde per Photometer bestimmt. Die Abbildung 19 zeigt dies exemplarisch für zwei Protein 165 spezifische Phagenklone und zwei Peptid 166 spezifische Phagenklone.

Ergebnisse

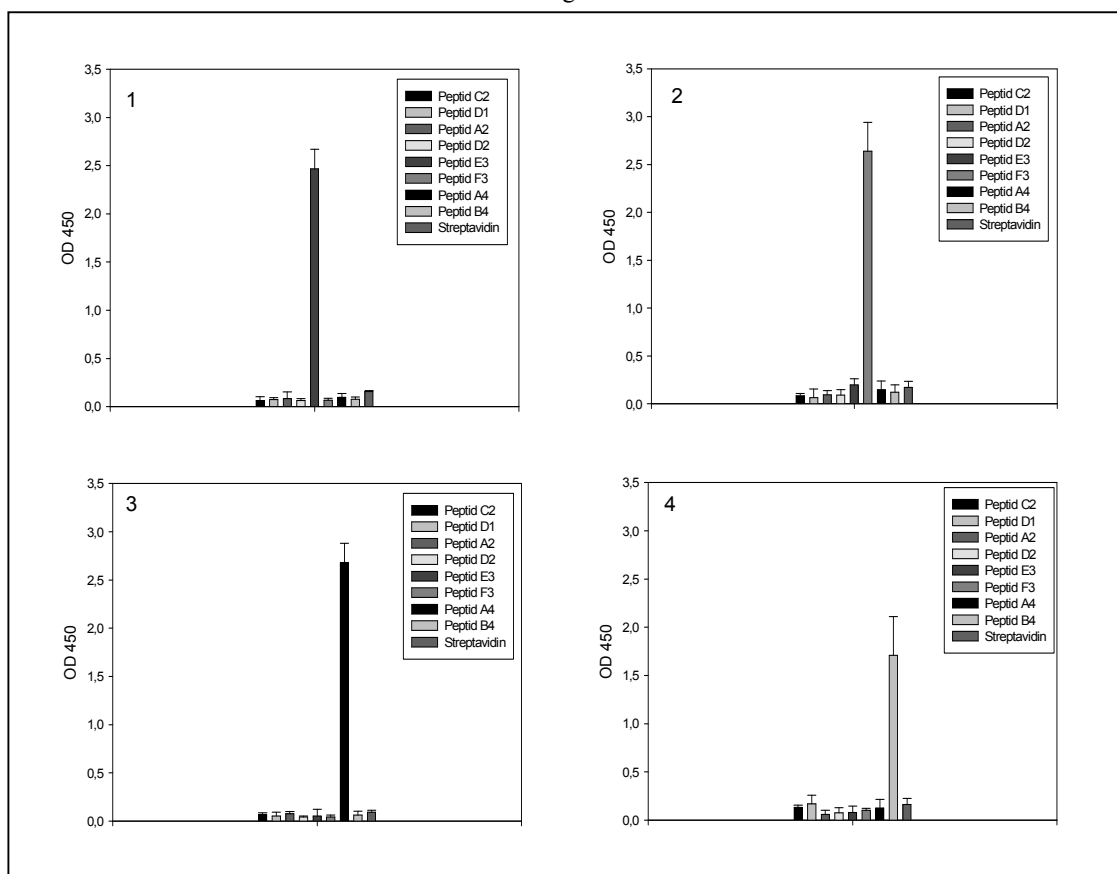


Abbildung 19: Histogramme der OD 450nm einzelner Binder auf deren spezifischen Peptide: Bild 1: Phage B4 (Peptid E3 Binder für Peptid 166); Bild 2: Phage C5 (Peptid F3 Binder für Peptid 166); Bild 3: Phage C6 (Peptid A4 Binder für Peptid 165); Bild 4: Phage G7 (Peptid B4 Binder für Peptid 165). Die Abszisse gibt die einzelnen getesteten Peptide und die Ordinate die OD bei 450nm wieder. Die übrigen Peptide (C2, D1, A2, D2) sind irrelevante Kontrollpeptide, ebenso dient Streptavidin als zusätzliche Negativkontrolle.

Die in Abbildung 19 dargestellten Histogramme zeigen die OD 450nm für spezifisch bindende Fab-Antikörper. Die Peptide C2 und D1 sind irrelevante Kontrollpeptide. Der in Abbildung 19-1 gezeigte Phage B4 bindet ausschließlich an Peptid E3 (Klon 166, OD450 bei 2,5). Der in Abbildung 19-2 gezeigte Phage C5 bindet ausschließlich an Peptid F3 (Klon 166, OD450 bei 2,8). Der in Abbildung 19-3 gezeigte Phage C6 bindet ausschließlich an Peptid A4 (Klon 165, OD450 bei 2,7). Der in Abbildung 19-4 gezeigte Phage G7 bindet ausschließlich an Peptid B4 (Klon 165, OD450 bei 1,9). An allen anderen Peptiden haben diese Phagen nicht gebunden (OD450 auf allen Peptiden kleiner 0,1). Dieses Bindungsverhalten wurde für zahlreiche weitere Phagenklone auf die einzelnen Fragmente analog zu Abbildung 19 gezeigt. Eine spezifische Bindung von 76 Phagenklonen (auch Binder genannt) an dem Peptid 166 Fragment E3 und von 80 weiteren Phagenklone auf dessen Fragment F3 wurde festgestellt. Für die Fragmente des Proteins 165 wurden weiterhin jeweils 69 Phagenklone auf Fragment A4 und 47 auf Fragment B4 selektiert. Die Abbildung 20 stellt die Anzahl an Binder pro Fragment schematisch dar. Die

Binder mit den höchsten Absorptionen für jedes Peptidfragment wurden auf eine 96er-Well-Platte überführt (8 Binder pro Fragment), jedem dieser Phagenklone wurde eine Laufnummer zugeteilt.

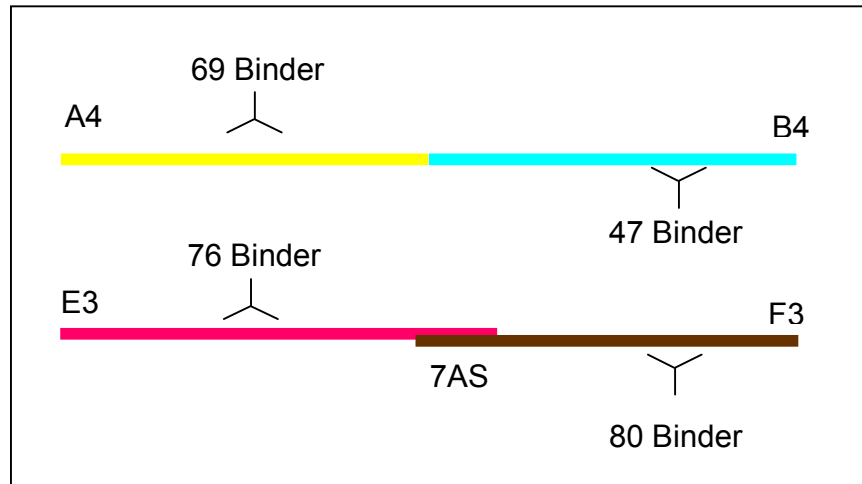


Abbildung 20: Schematische Darstellung der Peptidfragmente und ihrer spezifischer Binder. Die Peptide A4 und B4 sind Fragmente des Peptides 165 und die Peptide E3 und F3 des Peptides 166. E3 und F3 sind jeweils zu 7 Aminosäuren überlappend.

Nomenklatur: Die Binder mit der Endzahl 4 und 5 sind Peptid 166 spezifische Binder und mit der Endzahl 6 und 7 sind Protein 165 spezifische Binder. Der vorangestellte Buchstabe steht für differente Klone.

Charakterisierung der selektierten Binder: Die Charakterisierung ermöglicht es auf die Eigenschaften der Klone einzugehen und identische Binder zu identifizieren. Die Binder wurden jeweils in 750ml Kulturen als lösliche Fab-Antikörper produziert und aufgereinigt. Der Produktionsnachweis der Fab-Antikörper erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese und einer Coomassie-Färbung.

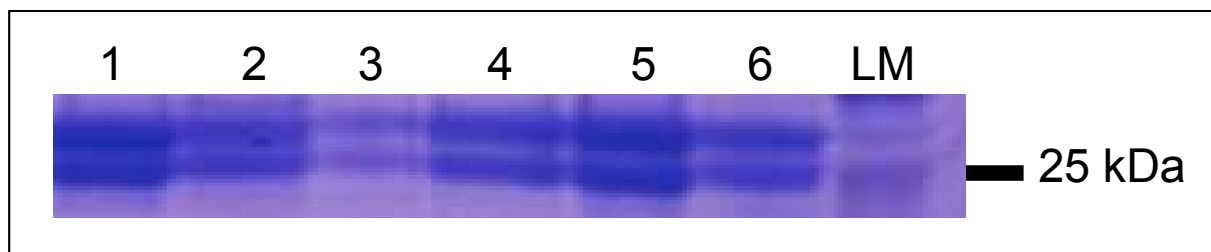


Abbildung 21: Coomassie Färbung einer Fab-Antikörperelution in einer SDS Gelelektrophorese. 1: F2 (Streptavidin Binder); 2: C4 (E3 Binder); 3: B5 (F3 Binder); 4: C5 (F3 Binder); 5: C6 (A4 Binder); 6: G7 (B4 Binder).

Die denaturierten Fab-Antikörper laufen etwa auf Höhe der 25kDa Bande des Längenmarkers. Die 2 untereinander liegenden dominanten Banden jeder Lauflinie stellen die schwere und die leichte Kette eines jeden Fab-Antikörpers dar. Abbildung 21 zeigt exemplarisch eine solche Auftrennung für die Fab Klone F2, C4, B5, C5, C6 und G7. Die weiteren 27 Binder ließen sich in analoger Weise darstellen.

DNA Fingerprinting: Ziel des DNA Fingerprints ist der direkte Vergleich des RFLP-Musters der Binder zum Zwecke der Identifikation identischer Klone.

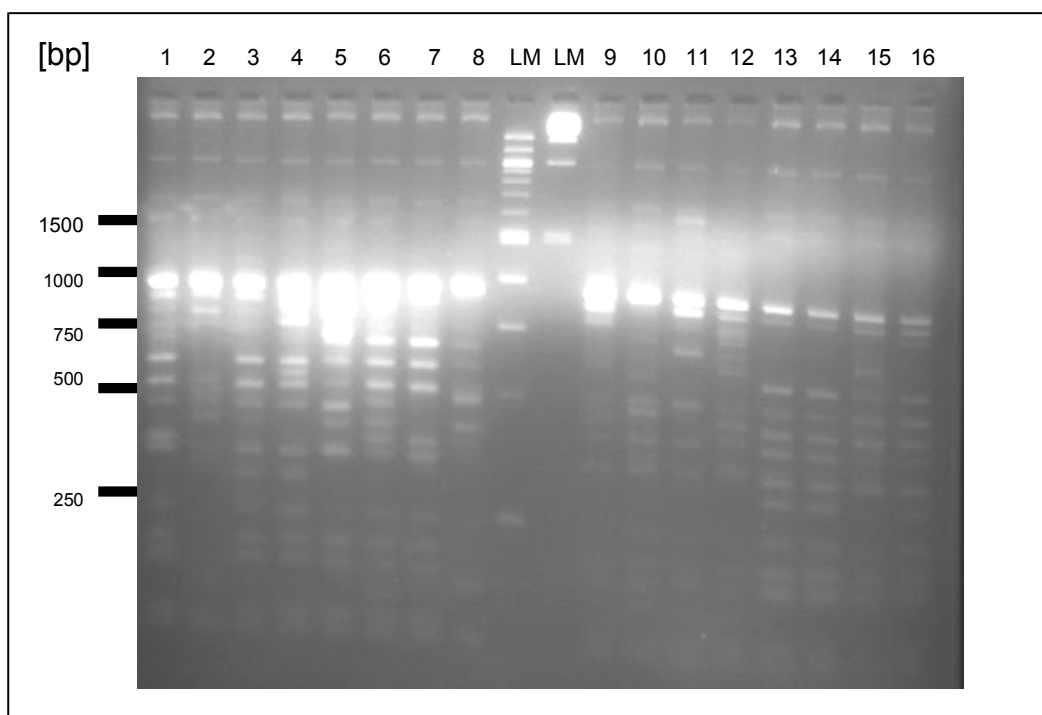


Abbildung 22: Gelelektrophoretische Auftrennung des PCR-Verdaus der Peptid A4-Binder (Lane 1 bis 8) und der B4-Binder (Lane 9 bis 16).

In Abbildung 22 ist die gelelektrophoretische Auftrennung der Restriktionsverdaue der DNA der Peptid-A4 und –B4-Binder (beide Peptide sind Protein 165 Fragmente) zu sehen. In Laufnummer 1 bis 8 sind die Verdaue der Peptid A4 Binder A6 bis H6 dargestellt. Für diese Klone kann keine 100% Homologie festgestellt werden. In Laufnummer 9 bis 16, sind die Verdaue der Peptid B4 Binder A7 bis H7 dargestellt. Nach diesem Verfahren sind die Klone D7 und E7 identisch. Ein solcher Verdau wurde auch für die Peptid 166 Binder durchgeführt. Die Auftrennung gestaltete sich ähnlich wie in Abbildung 22. Die Klone A5 und B5 (Fragment F3 Binder) sind laut Bandenmuster identisch. Die restlichen Klone wiesen keine Homologien untereinander auf. Nur jeweils einer der Doppelten (A5/B5) wurde zur weiteren Bearbeitung genutzt.

Die Fab-Antikörper standen für weitere analytische Schritte bereit. Eine Quantifizierung der Konzentrationen sollte helfen, wiederholbare Färbungen durchzuführen.

Bindungsspezifität der Fab Antikörper: Die spezifischen Fab-Antikörper haben ein ähnliches Bindungsverhalten auf die Peptide, wie die entsprechenden Phagen. Die Absorptionen sind analog. Die selektionierten Fab-Antikörper binden alle nur an ihren Zielpeptiden. Da die Seren, die Reaktivität auf die Peptide zeigen, auch auf die Hefeklone reaktiv sind, sollten die Fab-Antikörper auch die Hefeklone anfärben können. Daher wurden die Fab-Antikörper zur Färbung der Hefeklone 165 und 166 genutzt.

4.10. Bindungsaffinität der Fab-Antikörper zu den Hefeoberflächenproteinen

Um die Fab-Antikörper zum Nachweis der Peptide nutzen zu können, muss gezeigt werden, dass diese Antikörper dasselbe Zielantigen wie die Patientenserum erkennen. Es soll somit die Verbindung zum serologischen Reaktivitätsphänomen auf dem Hefepetid hergestellt werden. Daher werden die Fab-Antikörper zur Färbung der jeweiligen Hefeklone genutzt. Das Prinzip der Färbung verläuft analog zur Induktionsfärbung. Die Hefeklone 165 und 166 waren induziert und stellten sich, wie in Abbildung 10 zu ersehen dar. Bei Bindung der Fab-Klone (5µg/ml als Arbeitskonzentration) an den Hefen sollte das Bild ähnlich dem einer Induktionsfärbung sein. Eine Präabsorption ist in diesem Falle nicht nötig, da es sich um monoklonale Antikörper handelt.

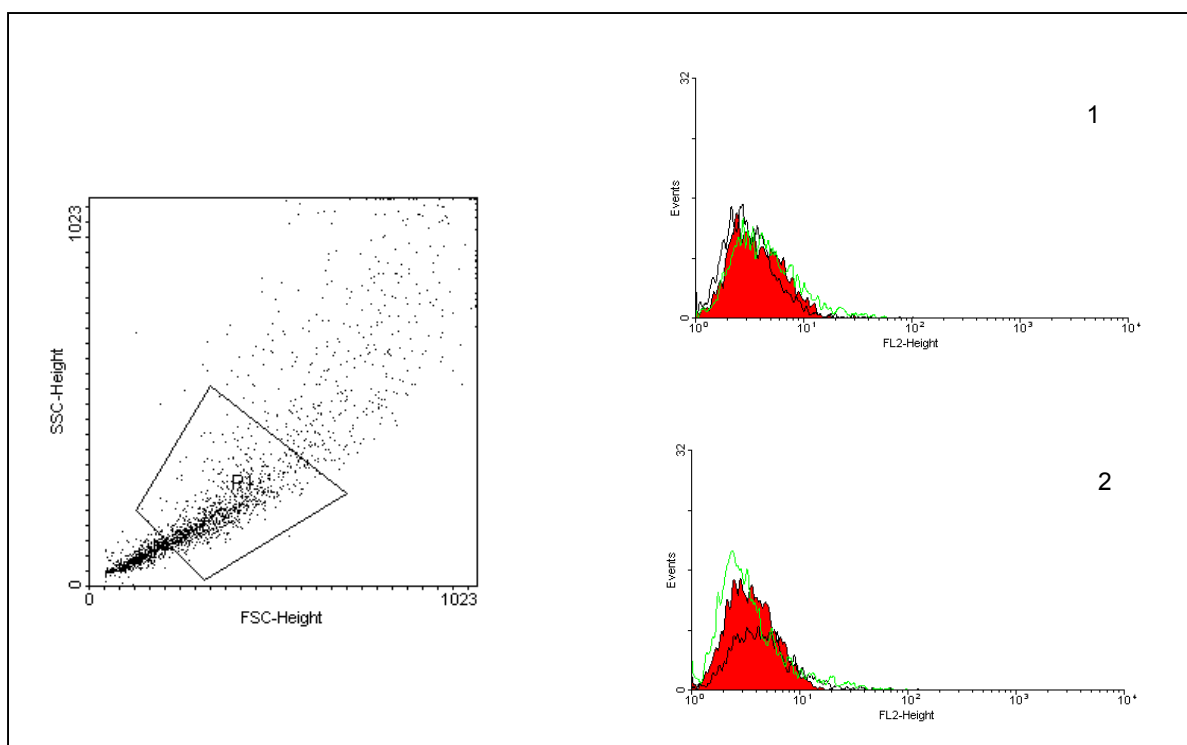


Abbildung 23: Dotplot und Histogramme zweier Fab-Antikörper Färbungen auf entsprechende Hefeklone. Die Abszisse des Dotplots gibt den FSC-Height an und die Ordinate den SSC-Height. Die Abszisse der Fluoreszenz-2 Graphen gibt die Verteilung der Fluoreszenzstärken der Hefepopulation und die Ordinate die Anzahl an Ereignissen (Events). Bild 1 bildet die Färbung eines Peptid A4 (Protein 165) spezifischen Fab-Antikörpers (hier Antikörper C6) ab, Bild 2 die Färbung eines Peptid B4 (Protein 165) spezifischen Fab-Antikörpers (hier Antikörper G7). Jeweils in rot ist die Färbung des Fab-Antikörpers auf die Targethefe, in schwarz die Färbung auf einer pYD1 Leerhefe, und in grün auf einer Kontrollhefe (26, 165) dargestellt. Der Dotplot zeigt die Verteilung der Hefen im FSC/SSC System.

In Abbildung 23 ist exemplarisch das Bindungsverhalten der Fab-Antikörper C6 und G7 auf den Hefeklon 165 gezeigt. Beide Antikörper binden spezifisch an je ein Peptidfragment des Proteins

165 (respektive Fragment A4 und B4). Die Färbehistogramme zeigen keine Abweichungen der Färbungen mit diesen Antikörpern von den Kontrollen (Bindungsverhalten auf pYD1 Leerhefe und auf Hefeklon 26). Diese Antikörper binden nicht an den Hefeklon 165. Dieses Phänomen wurde auf allen im ELISA auf die Protein 165-Fragmente spezifischen Bindern beobachtet. Man kann somit schlussfolgern, dass keiner dieser Fab-Klone die an der Hefeoberfläche exprimierten Zielstrukturen erkennt (unabhängig von der Konzentration des primären Fab-Antikörpers).

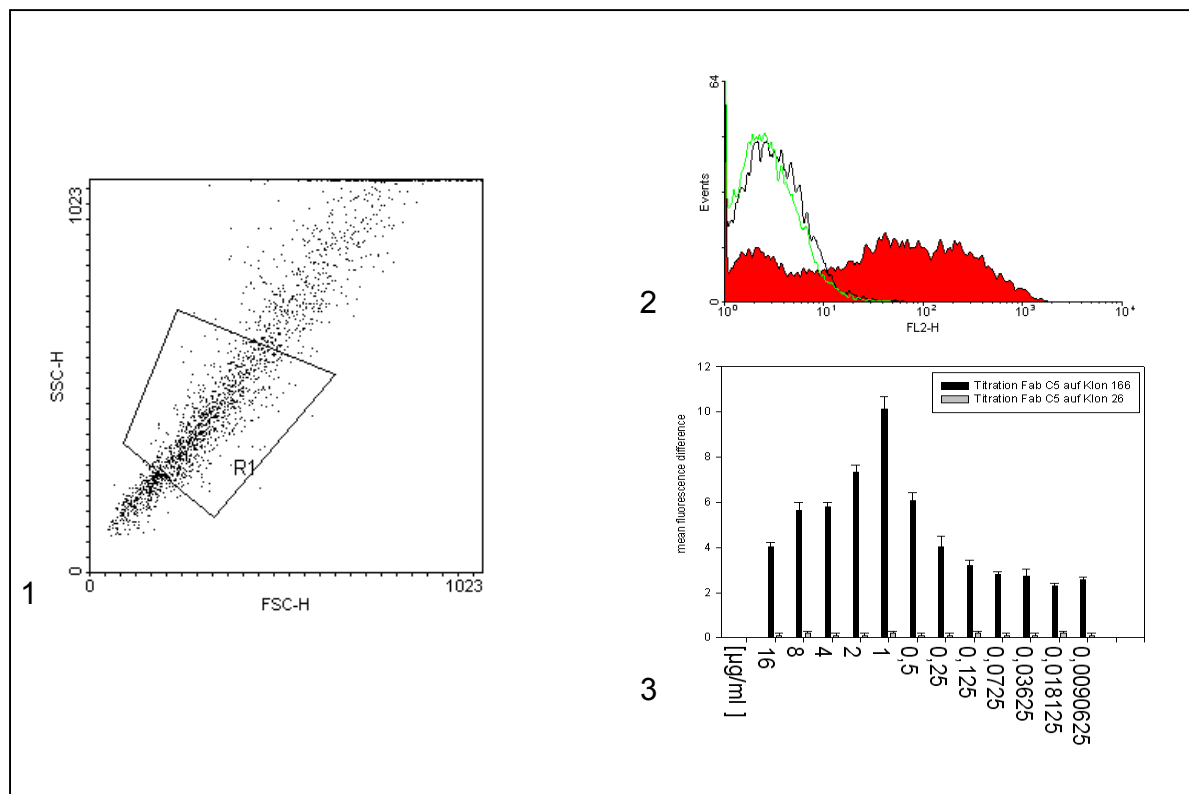


Abbildung 24: Dotplot (1), Histogramm (2) und Titration des Fab-Antikörpers C5 auf Hefeklon 166 (3). Bild 1: Die Abszisse zeigt den FSC-H und die Ordinate den SSC-H. Bild 2: Die Abszisse des Fluoreszenz-2 Graphen gibt die Verteilung der Fluoreszenzstärken der Hefepopulation und die Ordinate die Anzahl an Ereignissen (Events). Bild 3: Das Titrationshistogramm stellt an seiner Abszisse die Verdünnung des Fab-Antikörpers und an seiner Ordinate der Quotient der mittleren Fluoreszenzstärken (mean fluorescence Ratio). Das Histogramm zeigt die Färbung des Peptids 166 spezifischen Fab-Antikörpers C5 (Konzentration $1\mu\text{g/ml}$) auf Hefeklon 166 (rote Kurve). Diese Kurve ist der Induktionskurve dieses Hefeklons (siehe 4.4.) sehr ähnlich. In schwarz ist die Fluoreszenzstärke einer pYD1 Leerhefe und in grün die eines Kontrollklons (hier Hefeklon 26) dargestellt. Die Titrationskurve des Fab-Antikörpers C5 auf Hefeklon 166 zeigt bei abfallender Fab Konzentration ($16\mu\text{g}$, $8\mu\text{g}$, $4\mu\text{g}$, $2\mu\text{g}$, $1\mu\text{g}$, $0,5\mu\text{g}$, $0,25\mu\text{g}$, $0,125\mu\text{g}$, $0,0725\mu\text{g}$, $0,03625\mu\text{g}$, $0,018125\mu\text{g}$, $0,0090625\mu\text{g}$, je Konzentration pro ml) eine Zunahme der mean fluorescence Differenz (das PYD1 Hintergrundleuchten ist bereits von den numerischen Werten abgezogen). Der Dotplot zeigt die Verteilung der 166-Hefen im FSC/SSC System.

Abbildung 24 zeigt das Bindungsverhalten eines Peptid-166 spezifischen Fab Antikörper auf dem Hefeklon 166. Der Fab-Antikörper C5 (Fragment F3 spezifisch) bindet an dem Hefeklon 166. Dies ist hier ersichtlich durch die deutliche Rechtsverlagerung der Hefepopulation im Vergleich zu den Kontrollen (Bindungsverhalten desselben Antikörpers auf pYD1 Leerhefen und auf

Hefeklon 26). Dieses Bindungsverhalten lässt sich, wie in Abbildung 24 ersichtlich, konzentrationsabhängig titrieren. Mit abfallender Fab-Konzentration nimmt die Fluoreszenzstärke zunächst bis zu einem Maximum bei 1 µg/ml zu, und fällt anschliessend wieder mit zunehmender Konzentration ab. Die Verdünnungsreihe entspricht dem bereits erwähnten Phänomen der sterischen Inhibition. Der Fab-Antikörper C5 bindet an Hefeklon 166 in spezifischer Weise.

Der Fab-Klon C5, der das Peptid 166 bindet (Fragment F3), erkennt auch das auf der Hefeoberfläche exprimierte Peptid. Da die Patientenserum in den Serologien ebenfalls das Peptid erkannten, ist es zweckmäßig, diese Antikörper für weitere Untersuchungen zu nutzen. Die im ELISA Protein 165 spezifischen Fab-Klone erkennen nicht die auf der Hefeoberfläche präsentierten Peptide. Diese Antikörper können somit nicht für weitere Untersuchungen genutzt werden.

Mittels immunzytometrischer und immunhistochemischen Techniken soll der erstrebte Nachweis des Peptides 166 auf Zelllinien erfolgen.

4.11. Versuche zur Detektion der untersuchten Peptide

Fluoreszenzfärbungen auf Zelllinien: Die immunzytometrische Färbung von Zelllinien mit den Fab-Antikörpern dient dem Nachweis des Targetpeptids auf der Zelloberfläche. Die Charakterisierung der Fab-Klone in 4.10. erlaubt eine engere Selektion potenter Fab-Antikörper. Als Auswahlkriterium gilt für die Peptid 166 Binder die bestmögliche Bindung an der Hefenoberfläche. Es konnte somit der Fab-Klon C5 zur weiteren Nutzung selektioniert werden. In einer initialen Untersuchung wurde der genannte Fab-Antikörper in etwa 10 µg/ml Arbeitskonzentration auf allen Zelllinien gefärbt (Methoden 3.8.6.). Die beobachteten Bindungen wurden nochmals bearbeitet und wiederholt titriert. Die nachfolgenden Abbildungen sind gleich normiert. Die in diesem System eingezeichneten roten Kreise stellen die Zellpopulationen dar. Die Mittelwerte und Standardabweichungen resultieren aus einer dreifachen Wiederholung der Versuchsansätze. Exemplarisch wird für den Klon 166 das Titrationsverhalten des Fab-Antikörpers C5 gezeigt. In den folgenden Versuchen wurde der Fab B1 als Kontroll-Fab-Antikörper genutzt. Das Bindungsverhalten des C5 Fab-Antikörpers wird hier exemplarisch auf der Zelllinie HT 1080 gezeigt.

Die Abbildung 25 zeigt das Bindungsverhalten von Fab C5 auf der Zelllinie HT 1080. Im Färbehistogramm weist die Färbung der Zelllinie HT 1080 mit Fab C5 einen deutlichen Rechtsshift der Zellen im Vergleich zu den Kontrollen auf. Dies deutet auf eine spezifische Bindung an der Zelllinie hin und lässt sich konzentrationsabhängig titrieren. Mit abfallender Konzentration des Fab-Antikörpers nähert sich die Fluoreszenzstärke dem Hintergrund. Auf einer Kontrollzelllinie (HELA) findet sich in gleicher Konzentration des Fab C5 kein Unterschied zum Hintergrund. Ein weiterer Fab (B1, irrelevanter Antikörper) erzeugt bei gleichen Konzentrationen ebenso keinen Unterschied im Vergleich zum Hintergrund. Dies weist auf eine spezifische Bindung des Fab C5 auf der Zelllinie HT 1080 hin.

Ergebnisse

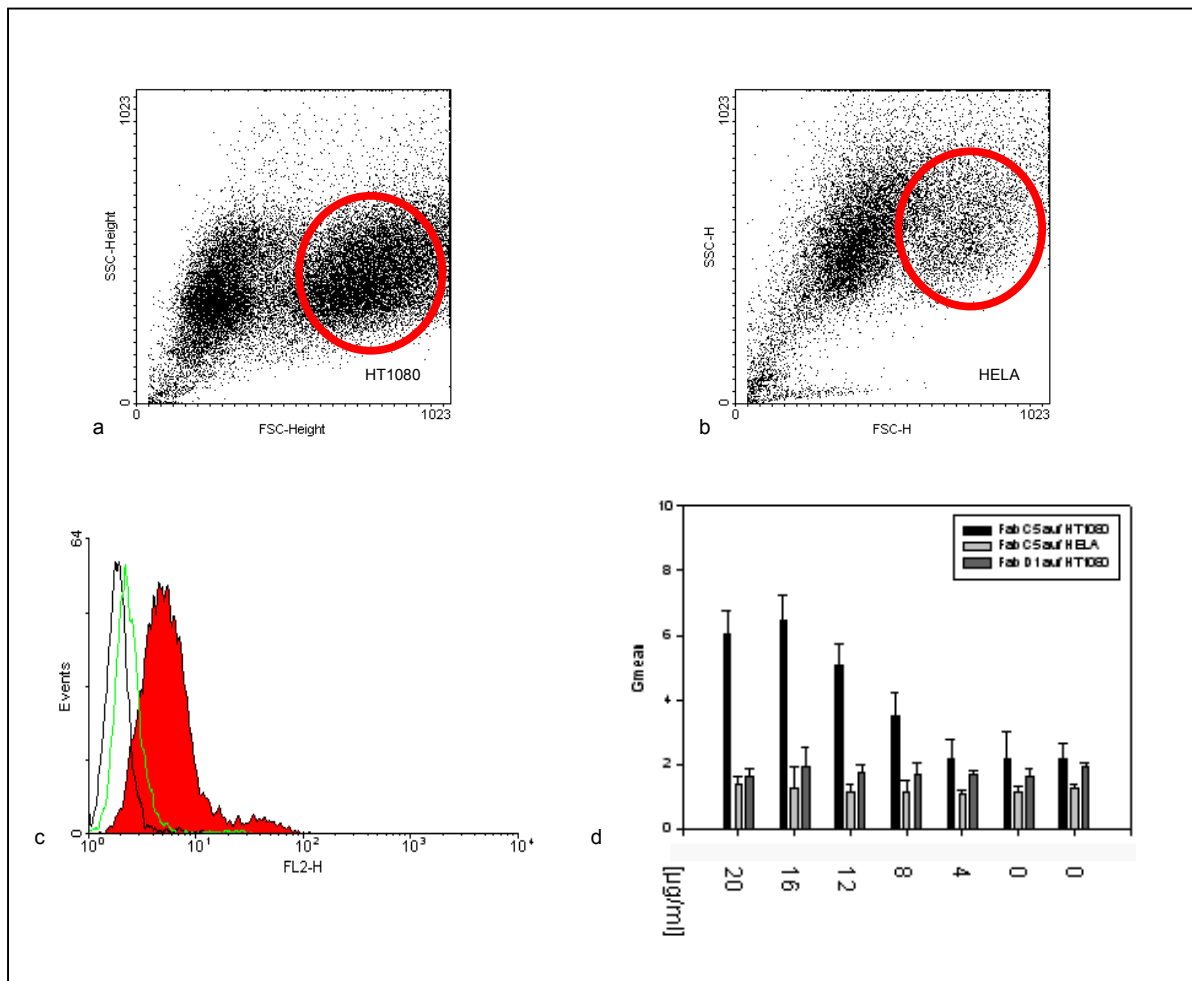


Abbildung 25: Dotplot, Färbe- und Titrationshistogramme der Färbungen der Zelllinie HT 1080 mit Fab C5. Bilder a und b: Die Abszisse gibt den FSC-H an und die Ordinate den SSC-H an. a: gibt die Verteilung der HT 1080 Zellpopulation im FSC/SSC System und b die Verteilung der HELA Zellpopulation im FSC/SSC System. Bild c: Die Abszisse des Fluoreszenz-2 Graphen gibt die Verteilung der Fluoreszenzstärken der Zellpopulation und die Ordinate die Anzahl an Ereignissen (Events). c zeigt das Leuchtverhalten der Färbung von HT 1080 mit Fab C5 (rot, 16 $\mu\text{g/ml}$ Arbeitskonzentration), mit sekundärem Färbesystem (schwarz) und mit einem irrelevanten Fab (grün, selbe Arbeitskonzentration). Bild d: Das Titrationshistogramm stellt an seiner Abszisse die Verdünnung des Fab-Antikörpers und an seiner Ordinate die mittlere Fluoreszenzstärke. d zeigt die Titrationskurve von Fab C5 auf HT 1080 (20; 16; 12; 8; 4; 2; 0 und 0, je $\mu\text{g/ml}$ Arbeitskonzentration), von Fab C5 auf HELA (selbe Arbeitskonzentrationen) und von Fab B1 auf HT 1080 (selbe Arbeitskonzentrationen).

Aus diesen Abbildungen ergibt das Bindungsverhalten des exemplarisch dargestellten Fab-Antikörpers C5 auf die Zelllinie HT 1080. Fab C5 bindet in ähnlicher Weise an weitere Zelllinien. Dies ist in Tabelle 16 dargestellt.

Bindungsverhalten der Fab-Klone auf Zelllinien im Überblick: Alle zur Verfügung stehenden Zelllinien wurden mit den Fab-Antikörpern gefärbt.

Tabelle 16: Übersichtstabelle des Bindungsverhaltens der Fab-Klone auf verschiedenen Zelllinien in der Immunzytometrie.

Zelllinie	Alab	MCF7	SKBR 7	HT 1080	CMS 5A	HEK	Hep 3b	Paca44	Panc 1	Skmel 23	Skmel 37	U266	HELA
B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C5	-	-	-	x T	-	-	-	x T	-	-	xT	-	-

Die Tabelle 16 zeigt das Bindungsverhalten der Fab-Klone auf die untersuchten Zelllinien. Ein „x“ weist auf einen darstellbaren Shift hin, im Vergleich zu den Kontrollen (sekundäres Färbesystem und irrelevanter Kontrollantikörper in gleicher Arbeitskonzentration, meist 10 µg/ml), der Zusatz „T“ auf eine wiederholt mögliche Titration des jeweiligen Fab-Klons. Der Fab-Antikörper C5, der eine Pankreaskarzinomzelllinie bindet (Paca44), wurde zur Färbung von Micro-arrays genutzt.

Immunhistochemische Färbung von Micro-arrays: Aus den, in Tabelle 16 genannten, Zelllinien wurden Parafinblöcke gegossen. Diese Blöcke wurden zur Herstellung von Micro-arrays genutzt. Diese Technologie erlaubt die Färbung zahlreicher Zelllinien auf einem Objektträger (siehe 3.9.3). Der spezifische Fab-Antikörper C5 wurde zur Färbung solcher Micro-arrays genutzt. Die Auswertung erfolgte qualitativ. Eine starke Färbung wird mit (+++), eine mittelstarke Färbung mit (++), eine schwache Färbung mit (+) und keine Farbstoffaufnahme mit (-) bezeichnet. Die Tabelle 17 gibt eine Übersicht des Bindungsverhaltens der Fab-Antikörper auf die Zelllinien im Micro-array. Die Abbildungen 26, 27, 28 und 29 zeigen dies optisch für die Zelllinien HT1080, SKmel 37, Panc1 und HEK. Als Negativkontrolle dient ein irrelevanter Fab-Antikörper B1. Die Fab-Antikörper wurden in einer Konzentration von 5µg/ml eingesetzt. Alle Färbungen und Auswertungen wurden unter Anleitung und Aufsicht von Frau Behnke-Sahner, aus dem Speziallabor für Immunhistochemie des Universitätsspitals Zürich, durchgeführt.

Tabelle 17: Übersichtstabelle des Bindungsverhaltens der Fab-Klone auf verschiedenen Zelllinien im Micro-array.

Zelllinie	Alab	MCF7	SKBR 7	HT 1080	CMS 5A	HEK	Hep 3b	Paca44	Panc 1	Skmel 23	Skmel 37	U266	HELA
B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C5	-	-	-	++	-	-	-	-	++	-	+++	-	-

Ergebnisse

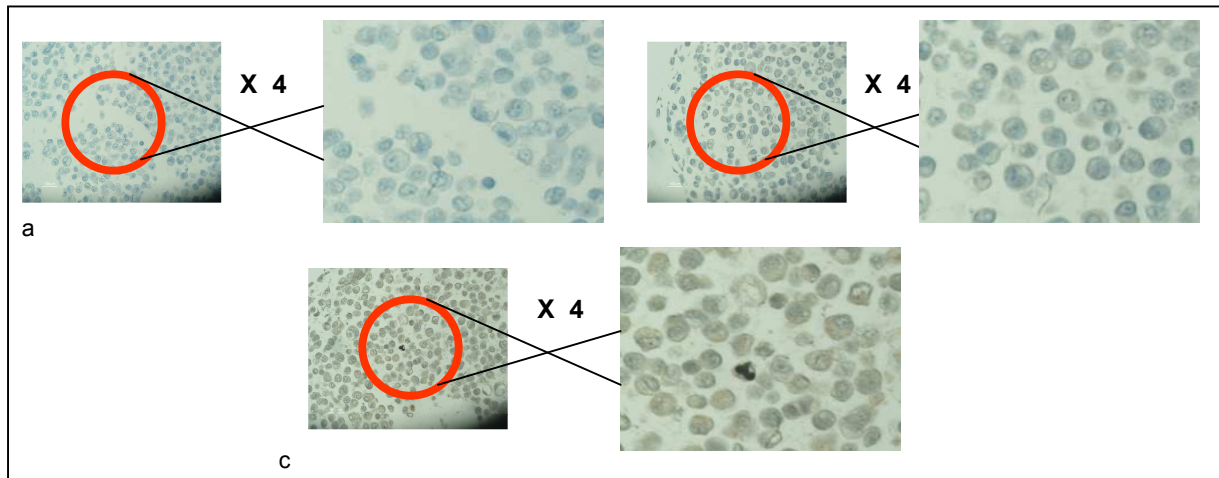


Abbildung 26: Mikroskopische Aufnahmen der Färbungen der Zelllinie HEK in einem Micro-array:
Bild a: Zelllinie HEK nur mit sekundärem Färbesystem; Bild b: Zelllinie HEK mit Fab B1(irrelevanter Kontrollantikörper); Bild c: Zelllinie HEK mit Fab C5 (Fab mit Spezifität für das Targetpeptid 166). Jeweils ist das rechte Bild, die 4x Vergrößerung des linken, im rot eingekreisten Abschnitt. Die Färbungen wurden mit einem biotinylierten anti-myc Antikörper und einer Streptavidin gekoppelter Peroxidase entwickelt.

Wie in Abbildung 26 ersichtlich, unterscheiden sich die Peroxidaseaktivitäten in b und c nur geringfügig, im Sinne einer unspezifischen Aktivität. Das reine sekundäre Färbesystem (a) bringt keine Peroxidaseaktivität zum Vorschein (-). Der Fab C5 bindet nicht an die Zelllinie HEK.

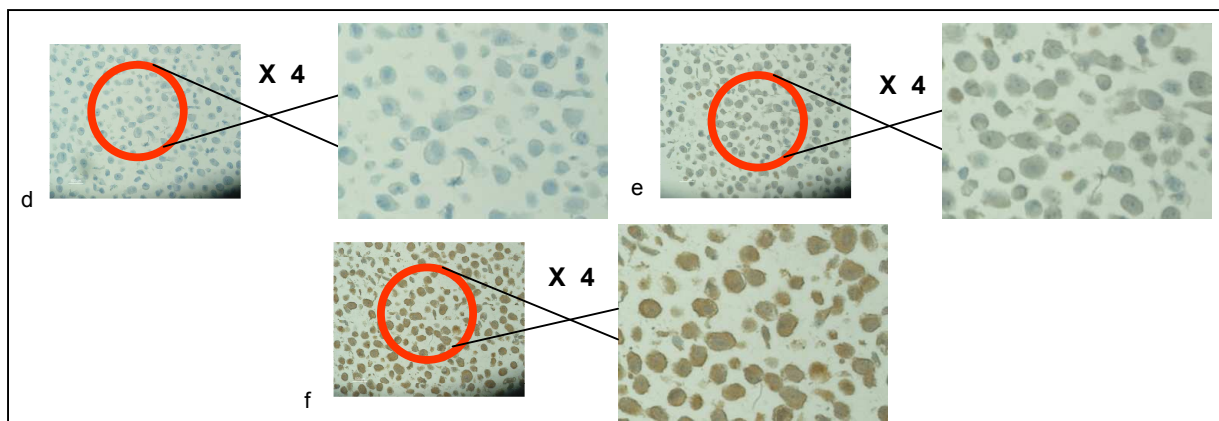


Abbildung 27: Mikroskopische Aufnahmen der Färbungen der Zelllinie SKmel 37 in einem Micro-array:
Bild a: Zelllinie Skmel 37 nur mit sekundärem Färbesystem; Bild b: Zelllinie Skmel 37 mit Fab B1(irrelevanter Kontrollantikörper); Bild c: Zelllinie Skmel 37 mit Fab C5 (Fab mit Spezifität für das Targetpeptid 166). Jeweils ist das rechte Bild, die 4x Vergrößerung des linken, im rot eingekreisten Abschnitt. Die Färbungen wurden mit einem biotinylierten anti-myc Antikörper und einer Streptavidin gekoppelter Peroxidase entwickelt.

Wie in Abbildung 27 ersichtlich, zeichnet sich die Zelllinie SKmel 37 durch eine deutliche Peroxidaseaktivität aus (f), im Vergleich zu den Kontrollen (d und e). Diese Bindung des Fab-Antikörpers C5 an die Zelllinie SKmel 37 wurde mit (+++) bewertet. Der Fab-Antikörper C5 bindet an die Zelllinie SKmel 37 im Micro-array.

Ergebnisse

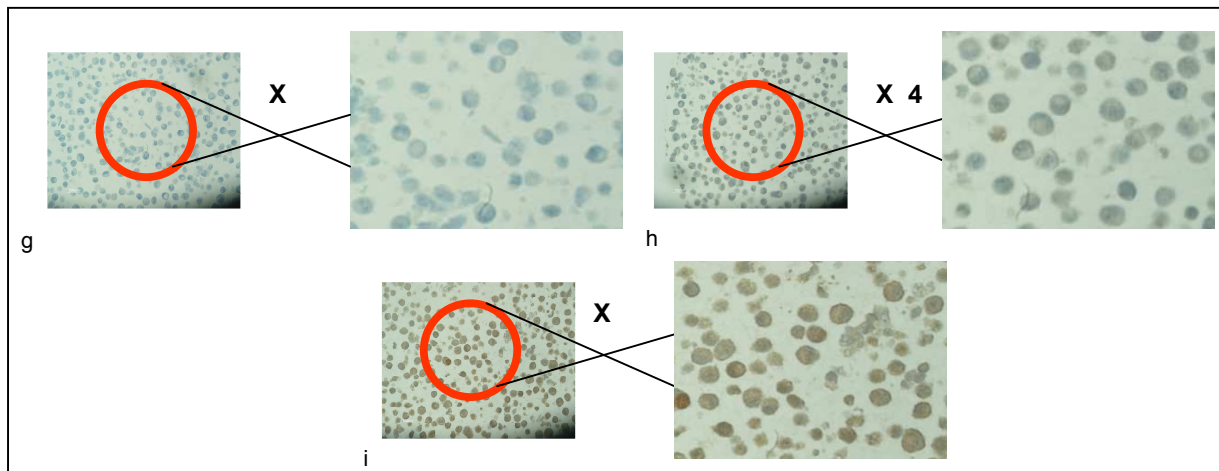


Abbildung 28: Mikroskopische Aufnahmen der Färbungen der Zelllinie HT 1080 in einem Micro-array: Bild a: Zelllinie HT 1080 nur mit sekundärem Färbesystem; Bild b: Zelllinie HT 1080 mit Fab B1(irrelevanter Kontrollantikörper); Bild c: Zelllinie HT 1080 mit Fab C5 (Fab mit Spezifität für das Targetpeptid 166). Jeweils ist das rechte Bild, die 4x Vergrößerung des linken, im rot eingekreisten Abschnitt. Die Färbungen wurden mit einem biotinylierten anti-myc Antikörper und einer Streptavidin gekoppelter Peroxidase entwickelt.

Wie in Abbildung 28 ersichtlich, zeichnet sich die Zelllinie HT 1080 durch eine deutliche Peroxidaseaktivität aus (i), im Vergleich zu den Kontrollen (g und h). Diese Bindung des Fab-Antikörpers C5 an die Zelllinie HT 1080 wurde mit (++) bewertet. Der Fab-Antikörper C5 bindet an die Zelllinie HT 1080 im Micro-array.

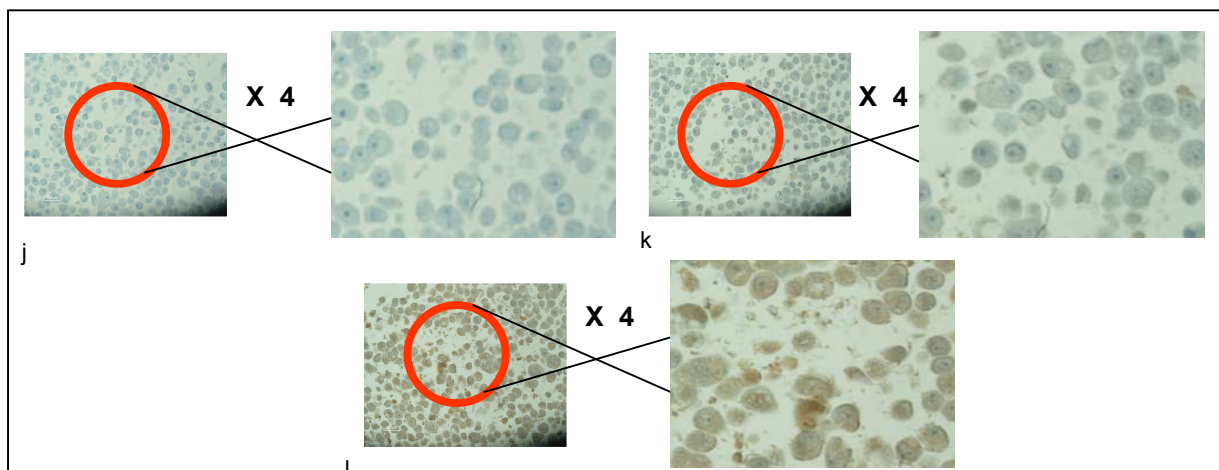


Abbildung 29: Mikroskopische Aufnahmen der Färbungen der Zelllinie Panc1 in einem Micro-array: Bild a: Zelllinie Panc1 nur mit sekundärem Färbesystem; Bild b: Zelllinie Panc1 mit Fab B1(irrelevanter Kontrollantikörper); Bild c: Zelllinie Panc1 mit Fab C5 (Fab mit Spezifität für das Targetpeptid 166). Jeweils ist das rechte Bild, die 4x Vergrößerung des linken, im rot eingekreisten Abschnitt. Die Färbungen wurden mit einem biotinylierten anti-myc Antikörper und einer Streptavidin gekoppelter Peroxidase entwickelt.

Wie in Abbildung 29 ersichtlich, zeichnet sich die Zelllinie Panc1 durch eine deutliche Peroxidaseaktivität aus (l), im Vergleich zu den Kontrollen (j und k). Diese Bindung des Fab-

Ergebnisse

Antikörpers C5 an die Zelllinie Panc1 wurde mit (++) bewertet. Der Fab-Antikörper C5 bindet an die Zelllinie HT 1080 im Micro-array.

Der Fab-Antikörper C5 bindet somit an den Zelllinien HT1080 und SKmel 37 sowohl in der immunzytochemischen als auch in der immunhistometrischen Färbung, an der Zelllinie Panc1 nur in der Immunhistochemie.

5. Diskussion

Eine komplexe cDNA Bank wurde hergestellt, die einen Teil des Proteoms von Pankreaskarzinomzellen auf der Hefeoberfläche exprimiert. Immun-reaktive Klone wurden isoliert und charakterisiert. Die interessantesten Hefeklone wurden in einer serologischen Reihenuntersuchung bezüglich ihrer Antigenität mit reaktiven Patientenseren untersucht. Ein Pool aus 99 Pankreaskarzinompatienten, 63 gesunden Spendern und 14 Seren von Pankreatitispatienten wurde zur Färbung der einzelnen Hefeklone genutzt. Einige der 10 cDNA-Klone zeigten nach Behandlungs- aber auch Beobachtungsgleichheit zwischen den Gruppen relevante Immunogenität. Weiterhin konnten gegen zwei dieser Antigene spezifische Fab-Antikörper selektioniert werden. Mit Hilfe von antigenspezifischen Fab-Antikörpern konnten in der Immunzytometrie und in der Immunhistochemie einige Tumorzelllinien angefärbt werden.

Die 10 selektionierten cDNA-Klone konnten auf DNA-Ebene charakterisiert, die kodierten Proteine induziert und als Antigen auf der Hefeoberfläche exprimiert werden. Die serologische Reihenuntersuchung ergab eine heterogene Reaktivität der Patientenseren auf die einzelnen Antigene. Für die Klone 13 und 16 konnte keine Reaktivität nachgewiesen werden. Die Pankreaskarzinomseren waren wenig reaktiv für die Klone 26 und 483-1 (je 4,2%), mäßig reaktiv für die Klone 482, 496 (je 6,2%) und 498 (8,2%), und stark reaktiv auf die Klone 483-2 (12,5%), 165 (10%) und 166 (29,9%). Die Kontroll-Seren dagegen blieben nicht oder nur gering reaktiv (höchstens 1,6% der Kontrollen, siehe unter 4.4.3.2.). Diese positiven Reaktivitäten waren titrierbar. Im Chi-Quadrat-Test konnte keine Korrelation zwischen den Befunden und der serologischen Reaktivität gezeigt werden ($p > 0,05$).

Klon 165 und 166 kodieren neue, unbekannte Proteine und wurden aufgrund ihrer hohen serologischen Reaktivität weitergehend untersucht. Mittels Phage-display Technologie wurden gegen synthetische Fragmente der beiden Antigene, Fab-Antikörper selektioniert, deren Spezifität im ELISA gesichert werden konnte. Einer der für das Peptid 166 spezifischen Fab-Antikörper bindet an der Hefeoberfläche, während die Protein 165 spezifischen Fab-Antikörper die zugehörigen Hefeklone nicht binden. Daher wurden nur der Hefeklon 166 bindende Antikörper

zur Färbung humaner Zelllinien im FACS und im Micro-array genutzt. Die Bindung dieses Fab-Antikörpers konnte auf einer Pankreaskarzinomzelllinie und auf 2 weiteren Zelllinien dargestellt werden.

Eine kritische Auseinandersetzung mit der Methodik, sowie eine Analyse der Literatur sollen helfen, Erklärungen für die hier erzielten Ergebnisse zu finden. Weiterhin soll die Bedeutung dieser Ergebnisse erarbeitet werden. Schließlich sollen Möglichkeiten der erweiternden Analyse vorgeschlagen werden.

5.1. Analyse der Methodik

Auswahl der Kontrollen: Zur Sicherung der Färbeergebnisse sind Positiv- aber auch Negativkontrollen nötig. Im Bezug auf die immunzytometrische Färbung von Zelllinien und die Micro-arrays mittels Fab-Antikörper, existierten zu Beginn dieser Arbeit keine gesicherten Kontrollen. Im weiteren Verlauf konnten wiederholt positive Färbekonstellationen als Positivkontrolle genutzt werden (z.B. Fab C5 auf HT1080). Als Negativkontrolle diente ein irrelevanter Fab-Antikörper der Arbeitsgruppe (B1). Diese später hinzugezogenen Kontrollen stellen, da in dieser Arbeit erworben, einen Methoden, bzw. untersucherabhängigen Bias dar. Ein weiterer möglicher Bias ist das Positivitätskriterium der Hefefärbungen.

Die Positivitätskriterien: Diese dienen bei der Interpretation der Ergebnisse dem Entscheid zwischen einer positiven und einer negativen Färbung. Sinngemäß unterliegt jede Färbung einer Experimentator- bzw. Umfeld-abhängigen Variabilität. Bestimmte Parameter (Alter der Antikörper, Farbstoffe, Seren, unterschiedliche Länge der Inkubationszeiten, z.B. bei größeren Serologien) können eine stärkere, bzw. schwächere Fluoreszenzstärke bedingen. Ideal wäre ein stetiges Kriterium, das diese Größen berücksichtigt. Unsere Arbeitsgruppe benutzte in vorangegangenen Publikationen eine willkürliche Grenze (mean fluorescence von 2, Mischo et al., 2003). Die Literatur zeigt für serologische ELISA-Daten z.B., eine Adaptation der Positivitätsgrenze in Abhängigkeit der gesunden Kontrollen (Mittelwert + 2x Standardabweichung, Fossa et al., 2004). Diese Formel wurde in dieser Arbeit als Positivitätskriterium festgesetzt. Dies erlaubte eine stete Wiederholbarkeit der Ergebnisse. Allerdings muss kritisch vermerkt werden, dass auch dieses Kriterium kein definitives ist. Andere

Serologien nutzen andere Grenzen (Scanlan et al., 1998, Devitt et al., 2006). Ein endgültiger Entschluss über die bestmögliche Positivitätsgrenze ist nicht möglich.

Die Auswahl der untersuchten Patientengruppen stellt einen weiteren potentiell limitierenden Faktor für die Aussagekraft der Ergebnisse dar.

Das Design der Patientengruppen: Die Auswahl und die Anzahl der Patienten sind entscheidend für die Aussagekraft der Untersuchung. Das klassische SEREX musste sich stets mit der Kritik der zu kleinen Patientengruppen auseinandersetzen (20-40 Seren, Scanlan et al., 1998). Um diesem entgegenzuwirken, bedienten sich die RAYS Publikationen größerer Serengruppen (bis 200, Wadle et al., 2005; Mischo et al., 2005). Sinngemäß korreliert die Aussagekraft positiv mit der Größe der untersuchten Gruppen. Weiterhin spielt die natürliche Verteilung der Patientencharakteristika eine wichtige Rolle für die Tragweite der Ergebnisse. Dies bedeutet, dass idealerweise die 99 Pankreaskarzinompatienten hinsichtlich ihrer Merkmale (Alter, Geschlecht, Stadium der Erkrankung, Art der Therapie, usw.) der Normalverteilung entsprechen. Einige Faktoren sind annähernd konform: die Pathologie (duktales Adenokarzinom), die geschlechtliche sowie die Stadien-Verteilung. Andere wie das Durchschnittsalter sind ungenügend.

Die Untersuchung der Patientenserien ist in der vorliegenden Arbeit als Fall-Kontroll-Studie angelegt. Ein wichtiger Punkt der statistischen Güte ist das Matching der gesunden Kontrollgruppe mit der untersuchten kranken Gruppe (Klug et al., 2004). Das heißt, dass jeder der gesunden Spender mit einem Patienten gematcht wird. Jeder der Spender sollte bis auf die Erkrankung, die Gegenstand der Untersuchung ist, mit einem bestimmten Patienten hinsichtlich möglichst vieler Merkmale übereinstimmen. In der Regel werden vor allem Alter und Geschlecht abgestimmt (Agudo et al., 1999). Der Erkrankungsgipfel des Pankreaskarzinoms liegt um die 7. Lebensdekade (siehe Einleitung). Die Schwierigkeit des Matchens besteht darin in diesem Alter entsprechende gesunde Spender zu finden. Allerdings sind diese Spender im Durchschnitt (40,8 Jahre) wesentlich jünger als die Pankreaskarzinompatienten. Die Problematik des Matchens ist die Rekrutierung. Dieses Optimum ließe sich wohl nur unter erheblichem Aufwand mit der Suche nach geeigneten Spendern erreichen. Publiizierte SEREX/RAYS-Analysen wurden auf ähnliche Weise zusammengestellt (Sahin et al., 1995, Mischo et al., 2003, Wadle et al., 2005 und 2006). Die bestmögliche Anpassung scheitert an der Durchführbarkeit (Minenkova et al., 2003). Die Problematik hinsichtlich des Verhältnisses von Aufwand und Nutzen wird dadurch ersichtlich.

Die Prävalenz der Antikörper gegen die jeweiligen Hefeklone kann somit nicht auf das Gesamtkollektiv der Pankreaskarzinompatienten verallgemeinert werden.

Alte Menschen sind in der Regel auch multimorbide Menschen. Etwa 10-15% der Bevölkerung leiden an Diabetes mellitus Typ II, diese Prävalenz ist noch höher in der Spalte der über 50 Jährigen. Bei Diabetes mellitus werden vermehrt Antikörper gegen Pankreasstrukturen registriert (Bingley et al., 2005), ebenso im Rahmen von Pankreatitiden (Kleef et al., 2006). Beide sind Risikofaktoren des Pankreaskarzinoms. Die Pankreatitis, ist in dieser Arbeit wohl außer Acht zu lassen, aufgrund negativer Kontrollen (Pankreatitispatientengruppe). Antikörper gegen körpereigene Strukturen werden ebenfalls im Rahmen anderer Autoimmunvorgänge beschrieben (siehe unter 5.3.1., Albani et al., 1994). Auch Infektionen können solcher Autoantikörper ursächlich sein (Krause et al., 2003). Es bietet sich eine Vielzahl nicht Karzinom-spezifischer Erklärungsansätze an, die gerade im höheren Alter nicht auszuschließen sind. Eine weitere Limitation der Untersuchung ist die Synthese der Peptide zur Selektion von Fab-Antikörpern.

Die Grenzen der weiterführenden Untersuchung: Ein großer Teil der *in vivo* synthetisierten Proteine wird posttranslational modifiziert, da Hefen einen entsprechenden Modifikationsapparat besitzen (Boder und Wittrup, 1997). Daraus wird ein Problem der Peptidsynthese zur Selektion von Fab-Antikörper ersichtlich. Es sind lineare, nicht native Peptide. Dies ist wahrscheinlich die Erklärung für die fehlende Bindung der Protein 165 Fab-Antikörper auf dem Hefeklon 165. Dennoch zeigten dieselben Patientenserum Reaktivitäten auf die Peptid-Fragmente und auf den Hefeklon. Dies legt den Verdacht nahe, dass entweder differente Antikörper an Hefe und Peptid gebunden haben oder, dass die Patientenantikörper andere Epitope binden, die von keinem der selektierten Fab-Antikörper erkannt werden. Aufgrund dieser fehlenden Bindung an den Hefeklon 165 wurden diese Antikörper nicht weiter bearbeitet. Es muss geschlossen werden, dass vermutlich aufgrund posttranslationaler Modifikationen des Hefe-Proteins, die Phage-Display Methode nicht für dieses Antigen geeignet war.

Einige der Kritikpunkte dieser Arbeit konnten erarbeitet werden. Insbesondere die Zusammenstellung der Serengruppen und die Synthese der Peptide limitieren die Aussagekraft der in dieser Arbeit erbrachten Ergebnisse. Nun sollen diese Ergebnisse mit der Literatur konfrontiert werden, um Erklärungsansätze zu finden.

5.2. Bewertung der identifizierten Antigene

Annexin A11 (Klon 482): Bei der durchgeführten Serologie zeigten 6,2% der untersuchten Pankreaskarzinompatientenseren einen relevanten Antikörpertiter gegen das isolierte Antigen Annexin A11 Hefepeptid. In der gesunden Kontrollgruppe waren 1,6% reaktiv. Die zelluläre Funktion von Annexin A11 wird in der Zytokinese angesiedelt (EST-Database, 2006, nach Boguski et al., 1993). Für dieses Antigen ist das Expressionsprofil laut EST-Database im gesunden Pankreasgewebe und im Adenokarzinom recht schwach (38 von 197492 untersuchten mRNAs). Im Rahmen autoimmuner Erkrankungen (systemischer Lupus erythematoses, Sjögren Syndrom und insbesondere der rheumatoiden Arthritis) werden vermehrt Antikörper gegen Annexin A11 gefunden (EST-Database). Bei einer Prävalenz in der erwachsenen Bevölkerung um 1% und einem Erkrankungsgipfel zwischen der 5. und 7. Lebensdekade (Albani et al., 1994), also ähnlich derer des Pankreaskarzinoms, ergäbe sich, dass potentiell mindestens einer der Pankreaskarzinompatienten an rheumatoider Arthritis erkrankt ist (ca 1%). Die Prävalenz von Immunvaskulitiden, wie dem Lupus erythematoses liegt bei 50 auf 100000 Einwohner (0,05%) (Albani et al., 1994). In Anbetracht dieser Erwägungen, muss kritisch hinterfragt werden, ob diese Ergebnisse tatsächlich einen Zusammenhang mit dem Pankreaskarzinom besitzen oder durch Komorbiditäten und Zufallsbefunde bedingt sind. Die oben genannten Zahlen sprechen eher für Letzteres.

DJ-1 (Klon 496): Bei der durchgeführten Serologie zeigten 6,2% der untersuchten Pankreaskarzinompatientenseren einen relevanten Antikörpertiter gegen das isolierte DJ-1-Hefeantigen. Gesunde Spender zeigten keine Reaktivitäten. DJ-1 ist ein Suppressor der PTEN Funktion (ein Tumor Suppressorgen). Eine Unterexpression des DJ-1 führt zu einer verminderten Phosphorylation der Phosphatidylinositol-3-Kinase. Im Rahmen des nicht kleinzelligen Bronchialkarzinoms (Kim et al., 2005) konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression eine Hyperphosphorylation derselben Kinase bewirkt (Machama und Dixon, 1998; Myers et al., 1998; Stambolic et al., 1998; Sun et al., 1999) sowie ein vermehrtes Zellüberleben (Gao et al., 2000; Goberdham et al., 1999; Huang et al., 1999). Weiterhin finden sich erhöhte DJ-1 Expressionsniveau in nicht kleinzellige Bronchialkarzinomen (Mac Keigan et al., 2003). Trotzdem ist in der Literatur keine Korrelation mit dem Pankreaskarzinom bekannt. Dennoch ist eine Assoziation des DJ-1 Proteins mit dem Pankreaskarzinom denkbar. Insbesondere, da erhöhte

IgG-Spiegel gegen das DJ-1 Protein bei Mammakarzinompatienten bekannt sind (Le Naour et al., 2001). Auch dies erklärt das Vorhandensein von IgGs bei Pankreaskarzinompatienten nicht, zeigt jedoch, dass das DJ-1-Protein immunogen ist.

Klon 165: Bei der durchgeführten Serologie zeigten 10,3% der untersuchten Pankreaskarzinompatientenseren einen relevanten Antikörpertiter gegen das Hefeprotein 165. Die Kontrollen zeigten keine Reaktivitäten. Vermutlich aufgrund der posttranslationalen Modifizierung dieses Antigens, konnten keine spezifischen Antikörper gegen das Hefeprotein 165 selektiert werden. In Datenbanken und in der Literatur gibt es keinen Anhalt für die Existenz einer zweiten CDS in der MMP11 Genkarte. In der Literatur finden sich vielerlei Erklärungsmöglichkeiten: Alan et al. konnte 2000 zeigen, dass die Synthese von Proteinen möglich ist, wenn sie auf der mRNA in mehreren ORF codiert sind. Weiterhin kommt es nach Ablesen eines Stop Codons normalerweise zur Translationstermination. Wenn eine Frameshiftmutation vorliegt (Nichtlesen der ersten Base des Codons), kann ein Stop Codon übergangen werden und die Translation fortlaufen (Farabaugh et al., 1993). Ausserdem zeigten Carnadella et al., 1995, dass trotz eines Stop Codons der dahintergelegene ORF translatiert wird. Zudem können im Laufe der Translation tRNAs sich von der mRNA ablösen und an einem anderen Codon binden (Craigen und Caskey, 1986). Bypassing kommt ebenfalls vor, es handelt sich um eine Ablösung der tRNA unter der Translation und der Neubindung an einem anderen nicht überlappenden Codon (Weiss et al., 1987). Diese Beispiele erläutern mögliche Mechanismen der ORF-Transkription. Bisher wurden verschiedene ORFs mit der SEREX-Methodik entdeckt, welche antigene Eigenschaften bezüglich der IgG-Reaktivität besitzen (Eichmüller et al., 2000). Diese Reaktivität könnte durch Tumor-Autolyse entstanden sein (Preuss et al., 2002). Ein anderer Erklärungsansatz für die serologische Reaktivität gegen das isolierte Antigen wäre die strukturelle Homologie mit einem bisher unbekannten Protein.

Klon 498: Bei der durchgeführten Serologie zeigten 8,2% der untersuchten Pankreaskarzinompatientenseren einen relevanten Antikörpertiter gegen das Hefeprotein 498. In der gesunden Kontrollgruppe waren 1,6% reaktiv. Im Rahmen von SEREX Arbeiten konnten bereits mehrmals unbekannte Klone isoliert werden. Diese kodieren für lange Proteine, wobei dann von hypothetischen Peptiden gesprochen wird. Der Klon 498 ist ein solches hypothetisches Peptid, dessen Existenz vorerst nur auf der Oberfläche der Hefe gesichert ist. Zahlreiche solcher

Peptide, mit oder ohne Homologien zu bekannten Klonen, wurden so charakterisiert (Minenkova et al., 2003). Obgleich ihre Bedeutung bis jetzt ungeklärt bleibt, ist die Entdeckung solcher Klone ein bekanntes Phänomen. Ein Rückschluss auf die Malignomassoziation kann weder ein- noch ausgeschlossen werden.

„Falsch translatierte Genprodukte“: Alle Aminosäureabfolgen, die nicht in einem bekannten Leserahmen abgelesen werden, kann man unter „Falsch translatierte Genprodukte“, in der Literatur als „out of frame“ bezeichnet, zusammenfassen. (Wang et al., 2005). Dies ist ein Sammelbegriff für alle Peptide und Proteine, die in einem anderen Leserahmen translatiert werden als der des Gens (unabhängig von der Ursache dieser Leserahmenänderung). Derartige Produkte finden sich immer wieder in der Literatur (Townsend et al., 1986 und 1988, Boon et al., 1989). Im Rahmen des Prostatakarzinoms konnten bereits hohe Autoreaktivitäten gegen 17 solcher Produkte gefunden werden (Wang et al., 2005). Die Klone 26, 483-1, 483-2, 165 und 166, kann man hinsichtlich ihrer Sequenz (hohe Homologie zu Teilen der MTA, NAPOR, IL15RA und MMP11-Gene) in diese Kategorie einordnen. Respektive 4,1%, 4,1%, 12,4%, 10% und 29,9% der untersuchten Pankreaskarzinompatientenseren weisen Antikörper gegen die translatierten Peptide auf. 1,6% der Kontrollen besitzen Antikörper gegen den Klon 26 und gegen den Klon 166. Ein spezifischer Peptid 166 Fab-Antikörper färbt eine Pankreaskarzinomzelllinie und 2 weitere Zelllinien an. Dieser Antikörper bindet an den zwei Tumorzelllinien sowohl im FACS als auch im Micro-array. Auf die Pankreaskarzinomzelllinien Paca44 und Panc1 bindet dieser Antikörper jeweils nur in einem dieser Verfahren. Dies könnte ein Hinweis auf eine zytoplasmatische Präsenz sein, die im FACS nicht erfasst wird, bzw. auf eine mögliche Denaturierung des Oberflächenpeptides im Micro-array. Trotzdem weisen diese Ergebnisse auf die Präsenz dieses Peptides in diesen Zellen.

Mikrosatelliteninstabilitäten (MSI), assoziiert mit einer „out of frame“-Peptidsynthese, sind in der Literatur mit einer vermehrten Immunogenität beschrieben. Dies sind kurze repetitive DNA Sequenzen als Folge eines defekten DNA Reparatursystems (Schwitalle et al., 2004). 15% humaner Kolonkarzinome exprimieren im Gewebe die resultierenden Peptide dieser MSI Frameshiftmutationen (Grady et al., 2005). Eine hohe Expression solcher Produkte korreliert mit längerem Überleben, wahrscheinlich aufgrund einer Lymphozyteninvasion des Tumorgewebes (Ayan et al., 2007). Diese Patienten weisen spezifische T-Zellen auf diese MHC-I restringierten

frameshift induzierten Neopeptiden (Linnebacher et al., 2001). Diese T-Zellen sind in der Lage die präsentierenden Zellen zu lysieren (Schwitalle et al., 2004). Weiterhin werden die Peptide auch an MHC-II präsentiert (Linnebacher et al., 2001). Eine SEREX-Arbeit konnte zeigen dass Patienten spezifische Antikörper gegen einige dieser „Falsch translatierten Peptide“ besitzen (Ishikawa et al., 2003).

Die in dieser Arbeit behandelten Peptide könnten ebenfalls aus MSI resultierenden Frameshifts hervorgehen. Das Vorkommen von MSI im Zusammenhang mit Pankreaskarzinomen trifft in der Literatur auf widersprüchliche Ergebnisse (Nakata et al., 2002). Neuere Untersuchungen vertreten die Ansicht, dass MSI beim Pankreaskarzinom recht selten ist, auch dann nur in Assoziation mit HNPCC (Osaka et al.). Dies findet sich wohl auch in der Beobachtung wieder, dass MSI-Karzinome nicht aus den Langerhanszellen, sondern aus protodifferenzierten Zellen des Pankreas stammen (Chu et al., 1997). Folglich ist MSI für das Pankreaskarzinom ein recht seltenes Phänomen. MSI scheint nicht die Hauptquelle dieser immunogenen Kurzpeptide zu sein.

10 bis 30% aller synthetisierten Proteine werden auf verschiedenen Ebenen (Transkription, Translation, post translationelle Modifikation) falsch gebildet (Yewdell et al., 2000). Diese missgebildeten Proteine werden durch das Zell-Proteasom abgebaut (Monaco und Nandi, 1995, Turner und Varsharsky, 2000). Nahezu alle präsentierten Strukturen an humanen Zelloberflächen stammen von zelleigenen Proteinen ab, die über das Proteasom z.B. in MHC-I Molekülen eingebaut werden (Engelhardt et al., 1994, Rammensee et al., 1995, Yewdell et al., 2001). So finden Epitope dieser fehlerhaften Peptide Zugang zum Immunsystem. Im Rahmen von Virusinfektionen konnte gezeigt werden, dass diese Peptide an MHC-I Komplexe gebunden werden. Seit 1996 werden diese Peptide von J.W. Yewdell als DRIPS (Defective Ribosomal Products) subsummiert. Diese DRIPS gelten mittlerweile als Hauptquelle für T-Zell-Epitope (Kui Shin Voo et al., 2006).

Eine mögliche und interessante Hypothese wäre, dass diese „Falsch translatierten Peptide“ den DRIPS zuzurechnen sind. Wie bereits erwähnt (siehe 4.5.2.), besitzen einige der oben genannten Peptide (165 und 166) Epitope, welche mit hoher Wahrscheinlichkeit MHC-II aber auch MHC-I Epitope darstellen können. Die Prozessierung als DRIP in einem MHC-II Komplex wäre somit eine mögliche Hypothese, um Teile dieser Antigene den B-Zellen zuzuführen.

Dennoch muss festgehalten werden, dass das Phänomen DRIPs im Bezug auf Tumore bislang in einer einzigen Publikation erwähnt ist, und dies unabhängig vom immunogenen Potential (Meister et al., 2007).

Trotzdem blieb die Frage offen, wie diese Antigene den B-Zellen zugänglich gemacht werden. Ein beschriebener Mechanismus der Zuführung der DRIPs an das Proteasom ist die Bindung durch Mitglieder der Hsp70 Familie (Yewdel et al., 1996). Im Rahmen des Pankreaskarzinoms ist diese Hitzeschockproteinfamilie hochreguliert (Aghdassi et al., 2007 und Ali et al., 2006). Einige Mitglieder dieser Superfamilie binden und präsentieren Peptidepitope an die Zelloberfläche wo sie z.B. NK-Zellen stimulieren (Multhof et al., 1998).

Diese Hsp70-Peptid Komplexe werden auch über einen endosomalen Vorgang in den Extrazellulärraum dem Immunsystem zugänglich gemacht (Mambula et al., 2006). Weiterhin stellen die Hsp70 prozessierten Peptide einen Stimulus für CD8+ T-Zellen dar (Udono et al., 1993). Diese Stimulation läuft über Antigen-präsentierenden-Zellen, allerdings nur wenn die Peptide an Hsp70 gebunden sind, insbesondere wenn aus apoptotischen Zellen freigesetzt (Flechtner et al., 2006).

Die Bindung der selektionierten Fab-Antikörper an einige der Zelllinien (Abb.25, 26 und 27), obwohl diese Peptide keine transmembranäre Domäne besitzen, ist ein Hinweis auf weitere Mechanismen zur Epitopräsentation an der Zelloberfläche. Die Hsp70 abhängige Präsentation wäre eine Hypothese.

Unter den genannten Hypothesen, bieten die DRIPs den interessantesten, und im Bezug auf die Theorie auch wahrscheinlichsten Ansatz. Zur Bestätigung, aber auch zur Wiederlegung dieser Hypothese fehlen entsprechende Daten in der Literatur, aber auch weiterführende Untersuchungen im Anschluss an diese Arbeit.

5.3. Ausblicke

Trotz der zahlreichen erzielten Ergebnisse bleibt diese Arbeit den endgültigen Beweis für die Existenz dieser Peptide schuldig. Auch die erstellten Hypothesen hinsichtlich ihrer Rollen und Herkunft bleiben Theorien.

Weitere Untersuchungen für den biochemischen Nachweis der identifizierten Proteine/Peptide werden nötig sein, um der Existenz und der Herkunft dieser Peptide nachzugehen.

Letzten Endes bleiben die weiterführenden Untersuchungsmöglichkeiten mannigfaltig, und sollten für diese potenten Klone in Betracht gezogen werden. Der Proteinnachweis, aber auch der Nachweis des Präsentationsmechanismus könnte dazu führen, dass diesen Antigenen ein therapeutischer Nutzen zukommt.

Die Prognose des Pankreaskarzinoms macht neue therapeutische Möglichkeiten erforderlich. Ein Antigen wie der Klon 166 mit Reaktivitäten in Patientenseren von nahezu 30% wäre für immuntherapeutische Ansätze interessant. Vakzinierungen und/oder Antikörpertherapien wären mögliche Ansatzpunkte in Abhängigkeit des Präsentationsmechanismus.

Literaturverzeichnis:

1. Aghdassi A, Phillips P, Dudeja V, Dhaulakhandi D, Sharif R, Dawra R, Lerch MM and Saluja A. (2007): Heat shock protein 70 increases tumorigenicity and inhibits apoptosis in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer research*, 67(2):616-25.
2. Agudo A and Gonzales C (1999): Secondary matching: a method for selecting controls in case control studies on environmental risk factors. *International Journal of Epidemiology*, 28:1130-1133.
3. Albani S (1994): Infection and molecular mimicry in autoimmune diseases of childhood. *Clinical and Experimental Rheumatology*; 12 (10):35-41.
4. Ali A, Phillips P, Dudeja V, Dhaulakhandi D, Sharif R, Dawra R, Lerch M., and Saluja A (2007): Heat Shock Protein 70 Increases Tumorigenicity and Inhibits Apoptosis in Pancreatic Adenocarcinoma. *Cancer Res.*, 67 (2):616–25.
5. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W and Lipmann JD (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402.
6. André T, Noirclerc M, Hammel P, Meckenstock R, Landi B, Cattani S, Selle F, Codoul JF, Guerrier-Parmentier B, Mokhtar R and Louvet C (2004): Phase II study of leucovorin, 5-fluorouracil and gemcitabine for locally advanced and metastatic pancreatic cancer (FOLFUGEM 2). *Gastroentérologie Clinique et Biologique*, 28 (8-9):645-50.
7. Ayan B, Bustin S and Dorudi S (2005): The immunogenicity of colorectal cancers with high-degree microsatellite instability. *World Journal of Surgical Oncology*, 3:26.

8. Bass S, Greene R and Wells JA (1990): Hormone phage: an enrichment method for variant proteins with altered binding properties. *Proteins*, 8:309-314.
9. Bingley PJ and Gale EAM (2006): Progression to type 1 diabetes in islet cell antibody-positive relatives in the European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial: the role of additional immune, genetic and metabolic markers of risk. *Diabetologia*, 49:881–890.
10. Boder ET and Wittrup KD (1997): Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nat Biotechnol*, 15:553-7.
11. Boder ET, Wittrup KD (2000): Yeast surface display for directed evolution of protein expression, affinity, and stability. *Methods Enzymol*, 328:430-44.
12. Boguski MS, Lowe TM and Tolstoshev CM (1993): dbEST--database for "expressed sequence tags". *Nat Genet.* 1993 Aug;4(4):332-3.
13. Bolzer C, Li G, Issels RD and Multhoff G (1998): Definition of extracellular localized epitopes of Hsp70 involved in an NK immune response. *Cell Stress and Chaperones*, 3(1):6-11.
14. Bustin SA, Li SR, Phillips S and Dorudi S (2001): Expression of HLA class II in colorectal cancer: evidence for enhanced immunogenicity of microsatellite-instability-positive tumours. *Tumour Biol.*, 22(5):294-8.
15. Burris H (1997): Assessing clinical benefit in the treatment of pancreas cancer: gemcitabine compared to 5-fluorouracil. *European Journal of Cancer*, 33(1):18-22.
16. Burris H (1997): Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *Journal of Clinical Oncology*, 15 (6):2403-13.
17. Cameron JL, Riall TS, Coleman J and Belcher KA (2006): One Thousand Consecutive Pancreaticoduodenectomies. *Annals of Surgery*, 244(1):10-16.

18. Cappellaro C., Hauser K., Mersa V., Watzele M., Watzele G., Gruber C. and Tanner, W. (1991): *Saccharomyces cerevisiae* α - and α -Agglutinin: Characterization of Their Molecular Interaction. *EMBO J.*, 10:4081-4088.
19. Carnardella L, Carratore V, Ciardiello A, Darnonte G, Benatti U and De Flora A (1995): Primary Structure of Human Erythrocyte Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (NADP[H])-Binding Protein FX: Identification With the Mouse Turn- Transplantation Antigen dP35B. *Blood*, 85(1):264-267.
20. Chen YT, Scanlan MJ, Sahin U, Tureci O, Gure AO, Tsang S, Williamson B, Stockert E and Pfreundschuh M (1997): A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94:1914-8.
21. Chomczynski P and Sacchi N (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.*, 162, 156-9.
22. Chu TM (1997): Molecular diagnosis of pancreas carcinoma. *J Clin Lab Anal.*, 11(4):225-31.
23. Clackson T, Hoogenboom HR, Griffiths AD and Winter G (1991): Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature*, 352:624-628.
24. Conger ME (1949): Paraffin tissue-block trimmer. *Am J Clin Pathol.*, 19(11):1070.
25. Craigen WJ and Caskey CT (1986): Expression of peptide chain release factor 2 requires high deficiency frameshift. *Nature*, 322(6076):273-5.
26. de Haard HJ, van Neer N, Reurs A, Hufton SE, Roovers RC, Henderikx P, Arends JW and Hoogenboom HR (1999): A large non-immunized human Fab fragment phage library that permits rapid isolation and kinetic-analysis of high affinity antibodies. *J Biol Chem*, 274:18218-30.

27. DeRisi J, Penland L, Brown PO, Bittner ML, Meltzer PS, Ray M, Chen Y, Su Y and Trent JM (1996): Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nature Genetics*, 14:457-460.
28. DeVries S, Nyante S, Korkola J, Segraves R, Nakao K, Moore D, Bae H, Wilhelm M, Hwang S, and Waldman F (2005): Array-Based Comparative Genomic Hybridization from Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Breast Tumors. *Journal of Molecular Diagnostics*, 7(1).
29. Devitt G, Meyer C, Wiedemann N, Eichmuller S, Kopp-Schneider A, Haferkamp A, Hautmann R and Zoller M (2006): Serological analysis of human renal cell carcinoma. *Int. J. Cancer*, 118:2210–2219.
30. Doyle HA and Mamula MJ (2001): Post-translational protein modifications in antigen recognition and autoimmunity. *Trends Immunol*, 22:443-9.
31. Eckert WA and Kartenbeck J (eds) (1997): *Proteine: Standardmethoden der Molekular- und Zellbiologie*“, Springer.
32. Elliot T, Bodmer H and Townsend A (1996): Recognition of out-of-frame major histocompatibility complex class I-restricted epitopes in vivo. *Eur. J. Immunol*, 26:1175.
33. Engelhard VH (1994): Structures of peptides associated with class I and class II MHC molecules. *Annu. Rev. Immunol.*, 12:181-207.
34. Eichmuller S, Usener D , Dummer R, Stein A, Thiel D and Schadendorf D (2001): Serological detection of cutaneous T-cell lymphoma-associated antigens. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98(2):629-634.
35. Farabaugh PJ, Zhao H, Vimaladithan A (1993): A novel programed frameshift expresses the POL3 gene of retrotransposon Ty3 of yeast: frameshifting without tRNA slippage. *Cell* 74(1): 93-103.

36. Fernandez-Madrid F, Tang N and Alansari H (2004): Autoantibodies to annexin XI-A and other autoantigens in the diagnosis of breast cancer. *Cancer Res*, 64:5089-96.
37. Fetteen JV, Roy N, and Gihoa E (1991): A frameshift mutation at the NH2 terminus of the nucleoprotein gene does not affect generation of cytotoxic T lymphocyte epitopes. *J. Immunol.*, 147:2697.
38. Fenton RG, Longo DL and Schäfer R (eds) (2002): *Onkologische Zellbiologie*. 15. Auflage, *Harrisons innere Medizin*.
39. Flechtner JB, Cohane KP, Mehta S, Slusarewicz P, Kays Leonard A, Barber BH, Levey DL, and Andjelic S (2006): High-Affinity Interactions between Peptides and Heat Shock Protein 70 Augment CD8 T Lymphocyte Immune Responses. *The Journal of Immunology*, 177:1017–1027.
40. Fogar P, Basso D, Pasquali C, De Paoli M, Sperti C, Roveroni G, Pedrazzoli S and Plebani M (1997): Neural cell adhesion molecule (N-CAM) in gastrointestinal neoplasias. *Anticancer Research*, 17 (2B):1227-30.
41. Fossa A, Berner A, Fossa S, Hernes E, Gaudernack G and Smeland B (2004): NY-ESO-1 protein expression and humoral immune responses in prostate cancer. *The Prostate*, 59:440-447.
42. Collins FS, Trent JM and Köble K (eds) (2002): *Genetische Grundlagen von Krebserkrankungen*. 15. Auflage, *Harrisons innere Medizin*.
43. Frazier ML, Inamdar N, Alvula S, Wu E and Kim YH (1998): Few point mutations in elongation factor-1gamma gene in gastrointestinal carcinoma. *Molecular Carcinogenesis*, 22(1):9-15.
44. Friess H (1998): bax, but not bcl-2, influences the prognosis of human pancreatic cancer. *Gut*, 43 (3): 414-21.

45. Gao X, Neufeld TP, and Pan D (2000): *Drosophila* PTEN regulates cell growth and proliferation through PI3K-dependent and -independent pathways. *Dev. Biol.*, 221:404–418.
46. Goberdhan DC, Paricio N, Goodman EC, Mlodzik M, and Wilson C (1999): *Drosophila* tumor suppressor PTEN controls cell size and number by antagonizing the Chico/PI3-kinase signaling pathway. *Genes Dev.*, 13:3244–3258.
47. Grady WM, Willis J, Trobridge P, Romero-Gallo J, Munoz N, Olechnowicz J, Ferguson K, Gautam S and Markowitz S (2006): Proliferation and Cdk4 expression in microsatellite unstable colon cancers with TGFBR2 mutations. *Int. J. Cancer*, 118:600–608.
48. Greene EJ and Tew JG (1976): A Competition Assay for Antibody Avidity. *Cellular Immunology*, 26:1-13.
49. Guo X, Friess H, Graber HU, Kashiwagi M, Zimmermann A, Korc M and Büchler MW (1996): KAI1 expression is up-regulated in early pancreatic cancer and decreased in the presence of metastases. *Cancer Research*, 56 (21):4876-80.
50. Gurbuxani S, Bruey JM, Fromentin A, Larmonier N, Parcellier A, Martin F, Solary E and Garrido C (2001): Selective depletion of inducible HSP70 enhances immunogenicity of rat colon cancer cells. *Oncogene*, 20:7478-7485.
51. Hahn SA, Kern SE and Schmiegel WH (1997): Neue molekularbiologische Erkenntnisse aus: der Pankreaskarzinom- Forschung Diagnostische und therapeutische Perspektiven. *Deutsches Ärzteblatt*, 94:2614-2630.
52. Heinemann V, Allescher H-D, Busch M, Heiss MM, Helmberger T, Krämling HJ, Lersch C, Roder JD, Schalhorn A, Schoenberg MH, Waldner H, Wiebecke B and Zimmermann F (eds) (2001): *Karzinome des exokrinen Pankreas. Manual Gastrointestinale Tumore.*
53. Held G, Matsuo M, Epel M, Gnjjatic S, Ritter G, Sang YL, Tai TY, Cohen C, Old LJ, Pfreundschuh M, Reiter Y, Hoogenboom HR and Renner C (2004): Dissecting cytotoxic T cell

responses towards the NY-ESO-1 protein by peptide/MHC-specific antibody fragments. *Eur. J. Immunol.*, 34: 2919–2929.

54. Herr AJ, Gesteland RF and Atkins JF (2000): One protein from two open reading frames: mechanism of a 50 nt translational bypass. *The EMBO Journal*, 19(11):2671-2680.

55. Herr AJ, Atkins JF and Gesteland RF (2000): Coupling of open reading frames by translational bypassing. *Annual Review of Biochemistry*, 69: 343-372.

56. Herr AJ, Wills NM, Nelson CC, Gesteland RF and Atkins JF (2004): Factors That Influence Selection of Coding Resumption Sites in Translational Bypassing. *J. Biol. Chem.*, 279(12):11081-11087.

57. Hilgers W and Kern SE (1999): Molecular genetic basis of pancreatic adenocarcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 26:1-12.

58. Hoepfner LH, Dubovsky JA, Dunphy EJ and McNeel DG (2006): Humoral immune responses to testis antigens in sera from patients with prostate cancer. *Cancer Immunity*, 6:1.

59. Hong SH, Misek DE, Wang H, Puravs E, Giordano TJ, Greenson JK, Brenner DE, Simeone DM, Logsdon CD and Hanash SM (2004): An Autoantibody-Mediated Immune Response to Calreticulin Isoforms in Pancreatic Cancer. *Cancer Research*, 64:5504–5510.

60. Hoogenboom HR, Marks JD, Griffiths AD and Winter G (1992): Building antibodies from their genes. *Immunol. Rev.*, 130:41.

61. Horton J, Gelber RD, Engstrom P, Falkson G, Moertel C, Brodovsky H and Douglass H (1981): Trials of single-agent and combination chemotherapy for advanced cancer of the pancreas. *Cancer Treatment Reports*, 65 (1-2):65-8.

62. Huang H, Potter CJ, Tao W, Li DM, Brogiolo W, Hafen E, Sun H and Xu T (1999): PTEN affects cell size, cell proliferation and apoptosis during *Drosophila* eye development. *Development*, 126:5365–5372.
63. Iacobuzio-Donahue CA, Ryu B, Hruban RH and Kern SE (2002): Exploring the Host Desmoplastic Response to Pancreatic Carcinoma. *American Journal of Pathology*, 160:91-99.
64. Ishikawa T, Fujita T, Suzuki Y, Okabe S, Yuasa Y, Iwai T and Kawakami Y (2003): Tumor-specific Immunological Recognition of Frameshift-mutated Peptides in Colon Cancer with Microsatellite Instability. *Cancer research*, 63:5564–5572.
65. Jarutat T, Frisch C, Nickels C, Merz H and Knappik A (2006): Isolation and comparative characterization of Ki-67 equivalent antibodies from the HuCAL phage display library. *Biol. Chem.*, 387:995–1003.
66. Jeffreys AJ, Wilson V and Thein SL (1985): Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*, 314:67–73.
67. Jones LE, Humphreys MJ, Campbell F, Neoptolemos JP and Boyd MT (2004): Comprehensive Analysis of Matrix Metalloproteinase and Tissue Inhibitor Expression in Pancreatic Cancer. *Clinical Cancer Research*, 10:2832-2845.
68. Kallioniemi T (2001): Tissue micro-array technology for high throughput molecular profiling of cancer. *Human molecular genetics*, 10(7).
69. Kelleg S, Buchler P, Ludwig R, Buchler MW, Friess H (2003): Invasion and metastasis in pancreatic cancer. *Mol cancer*, 2:14.
70. Kelsen DP, Portenoy RK, Thaler HT, Niedzwiecki D, Passik SD, Tao Y, Banks W, Brennan MF and Foley KM (1995): Pain and depression in patients with newly diagnosed pancreas cancer. *Journal Of Clinical Oncology*, 13 (3):748-55.

71. Kim R, Peters M, Jang Y, Shi W, Pintilie M, Fletcher G, DeLuca C, Liepa J, Zhou L, Snow B, Binari R, Manoukian A, Bray M, Liu F, Tsao M and Mak T (2005): DJ-1, a novel regulator of the tumor suppressor PTEN. *Cancer Cell*, 7(3):263-273.
72. Kleeff J, Welsch TI, Löhr M, Singer R, Büchler MW and Friess H (2006): Die autoimmune Pankreatitis –eine chirurgische Krankheit? *Chirurg*, 77:154–165.
73. Kubuschok B, Xie X, Jesnowski R, Preuss KD, Romeike BFM, Neumann F, Regitz E, Pistorius G, Schilling M, Scheunemann P, Izbicki JR, Löhr JM and Pfreundschuh M (2004): Expression of cancer testis antigens in pancreatic adenocarcinoma cell lines, pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis. *Int. J. Cancer*, 109:568–575.
74. Kushner SR (eds) (1978): An improved method for transformation of *E. coli* with ColE1-derived plasmids., *Genetic Engineering*, 17-23, Edited by H. B. Boyer & S. Nicosia. Amsterdam:Elsevier.
75. Klug SJ, Bender R, Blettner M and Lange S (2004): Wichtige epidemiologische Studientypen. *Dtsch Med Wochenschr*; 129:7–10.
76. Kobayashi T, Nakanishi K, Kajio H, Morinaga S, Sugimoto T, Murase T and Kosaka K (1990): Pancreatic cytokeratin: an antigen of pancreatic exocrine cell autoantibodies in Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*, 33(6).
77. Krause P, Tureci O, Micke P, Buhl R, Huber C and Sahin U (2003): SeroGRID: an improved method for the rapid selection of antigens with disease related immunogenicity. *Journal of Immunological Methods*, 283:261–267.
78. Kui Shin V, Fu T, Wang HY, Tellam J, Heslop HE, Brenner MK, Rooney CM, and Wang RF (2004): Evidence for the Presentation of Major Histocompatibility Complex Class I–restricted Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 1 Peptides to CD8 T Lymphocytes. *J. Exp. Med*, 199(4):459–470.

79. Kulin S, Kishore R, Hubbard JB, and Helmerson K (2002): Real-Time Measurement of Spontaneous Antigen-Antibody Dissociation. *Biophysical Journal*, 83:1965–1973.
80. Kushner SR (eds) (1978): An improved method for transformation of *E. coli* with ColE1-derived plasmids. *Genetic Engineering*, 17-23. Amsterdam:Elsevier.
81. Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-5.
82. Lee IM, Sesso HD, Oguma Y and Paffenbarger RS (2003) : Physical activity, body weight, and pancreatic cancer mortality. *British Journal of Cancer*, 88 (5):679-83.
83. Le Naour F, Misek DE, Krause MC, Deneux L, Giordano TJ, Scholl S and Hanash SM (2001): Proteomics-based Identification of RS/DJ-1 as a Novel Circulating Tumor Antigen in Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, 7:3328–3335.
84. Linnebacher M, Gebert J, Rudy W, Woerner S, Yuan YP, Bork P and von Knebel Doeberitz M (2001): Frameshift peptide-derived T-cell epitopes: a source of novel tumor-specific antigens. *Int J Cancer.*, 93(1):6-11.
85. Lederberg EM and Cohen SN (1974): Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid. *Bacteriol.*, 119:1072-4.
86. Maehama T, and Dixon JE (1998): The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5- trisphosphate. *J. Biol. Chem.*, 273:13375–13378.
87. Maniatis T, Sambrook J, and Fritsch EF (eds) (1989): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2.Auflage.

88. Maple JT, Smyrk TC, Boardman LA, Johnson RA, Thibodeau SN and Chari ST (2005): Defective DNA Mismatch Repair in Long-Term (63 Years) Survivors with Pancreatic Cancer. *Pancreatology*, 5:220–228.
89. von Marschall Z, Riecken EO and Rosewicz S. (1998): Stromelysin 3 is overexpressed in human pancreatic carcinoma and regulated by retinoic acid in pancreatic carcinoma cell lines. *Gut*. 1998 Nov;43(5):692-8.
90. Matthew L, Sauter B and Bhardwaj N (1998): Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature*, 392.
91. Mayer RJ, Oettle H and Riess H (eds) (2002): Pankreaskarzinom. 15.Auflage Harrisons innere Medizin.
92. Mayrand SM and Green WR (1998): Non-traditionally derived CTL epitopes: exceptions that prove the rules? *Immunol. Today*, 19:551-556.
93. McCafferty J, Griffiths AD, Winter G and Chiswell DJ (1990): Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*, 348:552-554.
94. McGeer AJ, Detsky AS and O'Rourke K (1990): Parenteral nutrition in cancer patients undergoing chemotherapy: a meta-analysis. *Nutrition*, 6(3):233-40.
95. MacKeigan JP, Clements CM, Lich JD, Pope RM, Hod Y and Ting JP (2003): Proteomic profiling drug-induced apoptosis in non-small cell lung carcinoma: identification of RS/DJ-1 and RhoGDIalpha. *Cancer Res.*, 63:6928–6934.
96. Meister S, Schubert M, Neubert K, Herrmann K, Burger R, Gramatzki M, Hahn S, Schreiber S, Wilhelm S, Herrmann M, Jack HM, and Voll RE (2007): Extensive Immunoglobulin Production Sensitizes Myeloma Cells for Proteasome Inhibition. *Cancer Res.*; 67:4.

97. Michaud DS (2004): Epidemiology of pancreatic cancer. *Minerva chir*, 59:99-111.
98. Minenkova O, Pucci A, Pavoni E, Tomassi ADE, Fortugno P, Gargano N, Cianfriglia M, Barca S, Placido SDE, Martignetti A, Felici F, Cortese R and Monaci P (2003): Identification of tumor-associated antigens by screening phage displayed cDNA Libraries with sera from tumor patients. *Int. J. Cancer*, 106:534–544.
99. Mischo A, Wadle A, Wätzig K, Jäger D, Stockert E, Santiago D, Ritter G, Regitz E, Jäger E, Knuth A, Old L, Pfreundschuh M and Renner C (2003): Recombinant antigen expression on yeast surface (RAYS) for the detection of serological immune responses in cancer patients. *Cancer Immunity*, 3:5.
100. Mischo A, Kubuschok B, Ertan K, Preuss KD, Romeike B, Regitz E, Schormann C, de Bruijn D, Wadle A, Neumann F, Schmidt W, Renner C and Pfreundschuh M (2006): Prospective study on the expression of cancer testis genes and antibody responses in 100 consecutive patients with primary breast cancer. *Int. J. Cancer*, 118:696–703.
101. Monaco JJ and Nandi D (1995): The genetics of proteasomes and antigen processing. *Annu. Rev. Genet.*, 29:729-754.
102. Müller-Ladner U, Rütter W, und Burmester G (2004): Diagnose und Therapie der rheumatoiden Arthritis. *Dtsch. Med. Wochenschr.*, 129:1318-1321.
103. Myers MP, Pass I, Batty IH, Van der Kaay J, Stolarov JP, Hemmings BA, Wigler MH, Downes CP, and Tonks NK (1998): The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function. *Proc. Natl.Acad. Sci.USA*, 95:13513–13518.
104. Nagakubo D, Taira T, Kitaura H, Ikeda M, Tamai K, Iguchi-Ariga SM and Ariga H.(1997): DJ-1, a novel oncogene which transforms mouse NIH3T3 cells in cooperation with ras. *Biochem Biophys Res Commun.*;231(2):509-13.

105. Nakata B, Wang YQ, Yashiro M, Nishioka N, Tanaka H, Ohira M, Ishiwaka T, Nishino H and Hirakawa K (2002): Prognostic value of microsatellite instability in resectable pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*, 8: 2536–2540.
106. Nishimori I, Yamamoto Y, Okazaki K, Morita M, Onodera M, Kino J, Tamura S and Yamamoto Y (1994): Identification of Autoantibodies to a Pancreatic Antigen in Patients with Idiopathic Chronic Pancreatitis and Sjogren's Syndrome. *Pancreas*, 9(3):374-381.
107. Namy O, Duchateau-Nguyen G, Hatin I, Hermann-Le Denmat S, Termier M and Rousset JP (2003): Identification of stop codon readthrough genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, 31(9):2289-2296.
108. Nowell P (1976): The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, 194:23.
109. Okai T, Atsuhiko K, Hiroyuki W, Yutaka T, Junta S, Koushirou O, Yoshiharu M, Osamu M, Shinya M, Hajime N and Norio S (2000): Nonfunctioning Islet Cell Carcinoma of the Pancreas With High Serum CEA & CA19-9, K-ras Codon 12 Mutation, and Microsatellite Instability. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 30(3):307-310.
110. Osaka H, Yashiro M, Nishino H, Nakata B, Ohira M and Hirakawa K (2004): A case of osteoclast-type giant cell tumor of the pancreas with high-frequency microsatellite instability. *Pancreas*, 29(3):239-41.
111. Padera TP (2002): Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. *Science*, 296 (5574):1883-6.
112. Perez MM, Newcomer AD, Moertel CG, Go VL and Dimagno EP (1983): Assessment of weight loss, food intake, fat metabolism, malabsorption, and treatment of pancreatic insufficiency in pancreatic cancer. *Cancer*, 52(2):346-52.

113. Persic L, Roberts A, Wilton J, Cattaneo A, Bradbury A, Hoogenboom HR (1997): An integrated vector system for the eukaryotic expression of antibodies or their fragments after selection from phage display libraries. *Gene*, 187:9–18.
114. Qing X, Kong XT, Zhang GA, Hou XJ, Qiang H and Zhong RQ (2005): Proteomics-based identification of DEAD-box protein 48 as a novel autoantigen, a prospective serum marker for pancreatic cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 330:526–532.
115. Qian SB, Reits E, Neefjes J, Deslich JM, Bennink JR and Yewdell JW (2006): Tight Linkage between Translation and MHC Class I Peptide Ligand Generation Implies Specialized Antigen Processing for Defective Ribosomal Products. *The Journal of Immunology*, 177:227–233.
116. Papadopoulos N, Vogelstein B, Kinzler KW and Velculescu VE (2006): The Consensus Coding Sequences of Human Breast and Colorectal Cancers. *Science*, 314.
117. Patel SA, Adams R, Goldstein M and Moskaluk CA (2002): Genetic Analysis of Invasive Carcinoma Arising in Intraductal Oncocytic Papillary Neoplasm of the Pancreas. *American Journal of Surgical Pathology*, 26(8):1071-1077.
118. Rieder H, Ziegler A, Hahn SA, Rothmund M, Rehder H, Schäfer H, Schmiegel W, Bartsch DK (2002) : Das familiäre Pankreaskarzinom: Klinische Manifestation, genetische Grundlagen und Möglichkeiten der Früherkennung. *Deutsches Ärzteblatt*, 99(38):1991-2000.
119. Rammensee HG, Friede T and Stevanovic S (1995): MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics*, 41:178-228.
120. Rammensee HG, Friede T, Stevanovic S (1995): MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics*, 41:178–228.

121. Rammensee HG, Bachmann J, Philipp N, Emmerich N, Bachor OA and Stevanovic S (1999): SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics*, 50:213–219.
122. Richter W, Mertens T, Schoel B, Muir P, Ritzkowsky A, Scherbaum WA and Boehm BO (1994): Sequence Homology of the Diabetes-associated Autoantigen Glutamate Decarboxylase with Cocksackie B4-2C Protein and Heat Shock Protein 60 Mediates No Molecular Mimicry of Autoantibodies. *Jem*, Brief definitiv report.
123. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharff SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB and Erlich HA (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239:487-91.
124. Sahin U, Tureci O, Schmit H, Cochlo B, Johannes T, Schmitts R, Stenner F, Luo G, Schobert I and Pfreundschuh M (1995): Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:11810-11813.
125. Sanger F, Nicklen S, Coulson R (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74:5463-7.
126. Saif MW (2007): Pancreatic cancer, are we moving foreward yet? *JOP.J Pancreas* 2007, 8(2):166-176.
127. Scanlan MJ, Chen YT, Williamson B, Gure AO, Stockert E, Gordan JD, Türeci O, Sahin U, Pfreundschuh M and Old LJ (1998): Characterisation of human colon cancer antigens recognized by autologous antibodies. *Int. J. Cancer*, 76:652–658.
128. Scanlan MJ, Gure AO, Jungbluth AA, Old LJ and Chen YT (2002): Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy. *Immunol Rev*, 188:22–32.
129. Scheffer GL, Reurs AW, Jutten B, Beiboer SHW, van Amerongen R, Schoester M, Wiemer EAC, Hoogenboom HR and Scheper RJ (2002): Selection and characterisation of a phage-

displayed human antibody (Fab) reactive to the lung resistance-related major vault protein. British Journal of Cancer, 86:954–962.

130. Schlag PM, Eigler FW, Hossfeld DK, Junginger Th, Klöppel G, Kruck P, Meyer HJ, Müller RP, Pichlmaier H, Stock W, Trede M, Beger HG, Delbrück H, Gabbert H, Hauss J, Hermanek P and Queißer W (2001): Interdisziplinäre Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft und der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie: Exokrines Pankreaskarzinom. Arbeitsgemeinschaft Deutscher Tumorzentren (ADT), Berlin.

131. Schmitz-Winnenthal FH, Galindo-Escobedo LV, Rimoldi D, Geng W, Romero P, Koch M, Weitz J, Krempien R, Niethammer AG, Beckhove P, Buchler MW and Z'graggen K (2007): Potential target antigens for immunotherapy in human pancreatic cancer. Cancer Letters.

132. Schneider G and Schmid RM (2005): Pathogenesis of the ductal pancreatic adenocarcinoma: Implication for future therapies. Internist, 46:157-165.

133. Schoppmeyer K and Mössner J (2004): Best supportive care of pancreatic carcinoma. Internist, 45:769-776.

134. Schwitalle Y, Linnebacher M, Ripberger E, Gebert J and von Knebel Doeberitz M (2004): Immunogenic peptides generated by frameshift mutations in DNA mismatch repair-deficient cancer cells. Cancer Immunity, 4:14.

135. Sgaramella V, Van De Sande JH and Khorana HG (1970): Studies on polynucleotides, C.A novel joining reaction catalyzed by the T4-polynucleotide ligase. Proc Natl Acad Sci U S A., 67:1468-75.

136. Salamatu S, Mambula F and Calderwood SK (2006): Heat Shock Protein 70 Is Secreted from Tumor Cells by a Nonclassical Pathway Involving Lysosomal Endosomes. The Journal of Immunology, 177:7849–7857.

137. Scherer WF, Syverton JT and Gey GO (1953): Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J. Exp. Med.*, 97: 695.
138. Schubert U, Anton LC, Gibbs J, Norbury CC, Yewdell JW and Bennink JR (2000): Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature*, 404.
139. Shastri N, Nguyen V and Gontalez F (1995): Major histocompatibility class I molecules can present cryptic translation products to T-cells. *J. Bio. Chem.*, 270:1088.
140. Sjoblom T, Jones S, Wood LD, Williams Parsons L, Lin J, Barber TD, Mandelker D, Leary RJ, Ptak J, Silliman N, Szabo S, Buckhaults P, Farrell C, Meeh P, Markowitz SD, Willis J, Dawson D, Willson JKV, Gazdar AF, Hartigan J, Wu L, Liu C, Parmigiani G, Park BH, Bachman KE, Souriau C, Rothacker J, Hoogenboom HR and Nice E (2004): Human Antibody Fragments Specific for the Epidermal Growth Factor Receptor Selected from Large Non-immunised Phage Display Libraries. *Growth Factors*, 22 (3):185–194.
141. Smith AC, Dowsett JF, Russell RC, Hatfield AR and Cotton PB (1994): Randomised trial of endoscopic stenting versus surgical bypass in malignant low bileduct obstruction. *Lancet*, 17(344(8938)):1655-60.
142. Smith GP, Petrenko VA (1997): Phage display. *Chem.rev.*, 97:391-410.
143. Spindel ER, Zilberberg MD, Habener JF and Chin WW (1986): Two prohormones for gastrin-releasing peptide are encoded by two mRNAs differing by 19 nucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:19-23.
144. Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, Ruland J, Penninger JM, Siderovski DP and Mak TW (1998): Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell*, 95:29–39.

145. Stenner-Liewen F, Luo G, Sahin U, Tureci O, Koslovskin M, Kautz I, Liewen H and Pfreundschuh M (2000): Definition of Tumor-associated Antigens in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 9:285–290.
146. Stockert E, Jäger E, Chen YT, Scanlan MJ., Gout I, Karbach J, Arand M, Knuth A and Old LJ (1998): A Survey of the Humoral Immune Response of Cancer Patients to a Panel of Human Tumor Antigens. *J. Exp. Med.*, 187(8):1349-1354.
147. Stoltze L, Schirle M, Schwarz G, Schroter C, Thompson MW, Hersh LB, Kalbacher H, Stevanovic S, Rammensee H and Schild H (2000): Two new proteases in the MHC class I processing pathway. *Nat Immunol*, 1: 413-8.
148. Sun H, Lesche R, Li DM, Liliental J, Zhang H, Gao J, Gavrilova N, Mueller B, Liu X and Wu H (1999): PTEN modulates cell cycle pro-gression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5,-trisphosphate and Akt/protein kinase B signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:6199–6204.
149. Shooter RA and Gey GO (1952): Studies of the mineral requirements of mammalian cells. *Cancer Res.*, 12:264.
150. Tersmette AC, Petersen GM, Offerhaus GJ, Falatko FC, Brune KA and Goggins M (2001): Increased risk of incident pancreatic cancer among first degree relatives of patients with familial pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*, 7:738-44.
151. Tureci O, Sahin U and Pfreundschuh M (1997): Serological analysis of human tumor antigens: molecular definition and implications. *Mol Med Today*, 3(8):342-9.
152. Tureci O, Sahin U, Zwick C, Koslowski M, Seitz G and Pfreundschuh M (1998): Identification of a meiosis-specific protein as a member of the class of cancer/testis antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(9):5211–5216.

153. Towbin H, Staehlin T and Gordon J (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76:4350-4.
154. Townsend ARM, Rothbard J, Gotch FM, Bahadur G, Wraith D and McMichael AJ (1986): The epitopes of influenza nucleoprotein recognized by cytotoxic T lymphocytes can be defined with short synthetic peptides. *Cell*, 44:959-968.
155. Townsend A, Bastin J, Gould K, Brownlee G, Andrew M, Coupar B, Boyle D, Chan S and Smith G (1988): Defective presentation to class I-restricted cytotoxic T lymphocytes in vaccinia-infected cells is overcome by enhanced degradation of antigen. *J. Exp. Med*, 168:1211-1224.
156. Tumor Zentrum Berlin e.V. (2002): Interdisziplinäre Leitlinie Pankreaskarzinom, Empfehlung zur Diagnostik und Therapie.
157. Turner GC and Varshavsky A (2000): Detecting and measuring cotranslational protein degradation in vivo. *Science*, 289:2117-2120.
158. Udono H and Srivastava PK (1993): Heat Shock Protein 70-associated Peptides Elicit Specific Cancer Immunity. *J. Exp. Med*, 178:1391-1396.
159. Van Beijnum JR, Moerkerk PTM, Gerbers AJ, Brünei APDE, Arends JW, Hoogenboom HR and Hufton SE (2002): Target validation for genomics using peptide-specific phage antibodies: A study of five gene products overexpressed in colorectal cancer. *Int. J. Cancer*, 101:118-127.
160. Van Pel A and Boon T (1989): T cell-recognized antigenic peptides derived from the cellular genome are not protein degradation products but can be generated directly by transcription and translation of short subgenic regions. A hypothesis. *Immunogenetics*, 29:75-79.
161. Vieira J and Messing J (1987): Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods in Enzymology*, 153:3-11.

162. Vogelstein B and Kinzler KW (1993): The multistep nature of cancer. *Trends Genet*, 9:138.
163. Wadle A, Mischo A, Imig J, Wullner B, Hensell D, Watzig K, Neumann F, Kubuschok B, Schmidt W, Old LJ, Pfreundschuh M and Renner C (2005): Serological identification of breast cancer-related antigens from a *Saccharomyces cerevisiae* surface display library. *Int. J. Cancer*, 117:104–113.
164. Wadle A, Kubuschok B, Imig J, Wuellner B, Wittig C, Zwick C, Mischo A, Waetzig K, Romeike BFM, Lindemann W, Schilling M, Pfreundschuh M and Renner C (2006): Serological immune response to cancer testis antigens in patients with pancreatic cancer. *Int. J. Cancer*, 119:117–125.
165. Wang X, JianjunY, Sreekumar A, Varambally S, Shen R, Giacherio D, Mehra R, Montie JE, Pienta KJ, Sanda MG, Kantoff PW, Rubin MA, Wei JT, Ghosh D and Chinnaiyan AM (2005): Autoantibody Signatures in Prostate Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 353(12):1224-1235.
166. Weiss RB, Dunn DM, Atkins JF and Gesteland RF (1987): Slippery runs, shifty stops, backward steps, and forward hops: -2, -1, +1, +2, +5, and +6 ribosomal frameshifting. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*; 52:687-93.
167. Wigmore SJ, Plester CE, Richardson RA and Fearon KC (1997): Changes in nutritional status associated with unresectable pancreatic cancer. *Br J Cancer*, 75:106-109.
168. Wigmore SJ (2000): Characteristics of patients with pancreatic cancer expressing a novel cancer cachectic factor. *The British Journal Of Surgery*; 87 (1):53-8.
169. Wobser M, Keikavoussi P, Kunzmann V, Weininger M, Andersen MH and Becker JC (2006): Complete remission of liver metastasis of pancreatic cancer under vaccination with a HLA-A2 restricted peptide derived from the universal tumor antigen surviving. *Cancer Immunol Immunother*, 55:1294–1298.

170. Wollum A, Glaser DF, Bryant HC and Poolard HM (1952): Cytologic study of the gastric aspirate for carcinoma cells: paraffin-block technic. J Natl Cancer Inst, 12(4):715-21.
171. Yanagimoto H, Mine T, Yamamoto K, Satoi S, Terakawa N, Takahashi K, Nakahara K, Honma S, Tanaka M, Mizoguchi J, Yamada A, Oka M, Kamiyama Y, Itoh K and Takai S (2007): Immunological evaluation of personalized peptide vaccination with gemcitabine for pancreatic cancer. Cancer sci, 10:1349-7006.
172. Yewdell JW, Antbn LC, and Bennink JR (1996): Defective Ribosomal Products (DRiPs) A Major Source of Antigenic Peptides for MHC Class I Molecules? The journal of Immunology, 157:1823-1 826.
173. Yewdell JW, Schubert U and Bennink JR (2001): At the crossroads of cell biology and immunology: DRiPs and other sources of peptide ligands for MHC class I molecules. Journal of Cell Science, 114:845-851.
174. Yewdell JW and Nicchitta CV (2006): The DRiP hypothesis decennial:support, controversy, refinement and extension. TRENDS in Immunology, 27(8).
175. Zhong, H, De Marzo AM and Laughner E (1999): Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. Cancer res., 59:5830-5835.
176. Zhou B, Phan V, Liu X, Yuhaz A, Peighuo O, and Yen Y (2006): Production of a Monoclonal Antibody Against the hRRM2 Subunit of Ribonucleotide Reductase and Immunohistochemistry Study of Human Cancer Tissues. HYBRIDOMA, 25(5).

Danksagung:

Herrn Prof. Christoph Renner möchte ich für das Thema dieser Promotionsarbeit und für die freundliche Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe danken. Auch für die Förderung, die Diskussionsbereitschaft und die Möglichkeit in Zürich weiter unter seiner Leitung arbeiten zu können, gilt ihm mein zutiefst empfundener Dank.

Herrn Prof. Alexander Knuth und Herrn Prof. Michael Pfreundschuh danke ich herzlich für die freundliche Aufnahme in ihren Arbeitsgruppen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr.rer.nat. Andreas Wadle für die hervorragende Betreuung, die Anleitung beim Erlernen zahlreicher Methoden, sowie für die persönliche und menschliche Unterstützung. Ferner möchte ich ihm für seine aussergewöhnliche Fähigkeit, meine Begeisterung für wissenschaftliches Arbeiten zu wecken danken. Es war ein grosses Privileg, für ihn arbeiten zu dürfen.

Ebenso möchte ich Herrn Diplom-Biologe Jochen Imig, Herrn Diplom-Biologe Sascha Kleber, Frau Birgit Bette und Herrn Dino Lorrenz sowie allen Mitarbeitern der onkologischen Labore in Homburg und Zürich für ihre wissenschaftliche und persönliche Unterstützung danken.

Herrn PD. Dr. Boris Kubuschock möchte ich für die Patientenseren und die Einweisung in statistischen Methoden danken.

Herrn Dr. Peter Schrammel, Frau Martina Storz und Frau Behnke-Sahner danke ich für die Hilfe bei der Herstellung der Tissue-Micro-arrays und den immunhistologischen Färbungen.

Darüber hinaus möchte ich meinen Eltern und Freunden für die Unterstützung während dieser Zeit danken.

Abschließend möchte ich Frau Lisanne Zimmermann und Frau Julia Knüppel für das Korrekturlesen und ihre konstruktive Kritik danken.

Vorabveröffentlichungen:

Veröffentlichte wissenschaftliche Beiträge zu nationalen und internationalen Tagungen (Abstracts)

Wadle A, Kobold S, Kubuschok B, Bette B, Pfreundschuh M, Renner C (2005): Serological identification of pancreatic cancer related antigens from an optimized *Saccaromyces cerevisiae* surface display library. *Onkologie*, 28(3):1-275.

Kobold S, Wadle A, Knuth A, Renner C (2007): Serological identification and immunological detection of pancreatic cancer associated antigens. 8th Brupbacher Symposium, Zürich, Abstract book.

Kobold S, Wadle A, Kleber S, Fischer E, Schrammel P, Moch H, Knuth A, Renner C (2008): Identification of a novel breast cancer specific antigen expressed on cell surface. *Onkologie*, 31(4) 1-240.

Veröffentlichte wissenschaftliche Arbeiten in internationalen Zeitschriften (Paper)

Fischer E*, Kobold S*, Imig J, Kleber S, Knuth A, Renner C, Wadle A: Mistranslated mRNA induce high titer humoral response in cancer patients. *Journal of Immunology*, in Revision.

*: zu gleichen Teilen an dieser Publikation beteiligt (contributed equally)

Lebenslauf:

Persönliche Daten:

Name, Vorname:	Sebastian Kobold
Geburtsdatum:	26.08.1983
Geburtsort:	Würzburg
Staatsangehörigkeiten:	deutsch und französisch
Eltern:	Dr. Gustav Kobold, Kardiologe Catherine Kobold, geb. Savalette, Lehrerin
Geschwister:	eine Schwester
Familienstand:	ledig

Ausbildung

Schulbildung:

1989 –1994 Besuch der deutsch-französischen Grundschule in Saarbrücken.

1994 –2001 Besuch des deutsch-französischen Gymnasiums in Saarbrücken, französische Abteilung, Abschluss: Abitur 2001.

Studium:

2001 – 2007 Studium an der medizinischen Fakultät des Saarlandes in Homburg.

August 2003 Physikum.

August 2006 - Juli 2007 Praktisches Jahr in Bordeaux, Zürich und Homburg.

Approbation im Dezember 2007

Promotion:

April 2004 – Januar 2006 : Promotion bei Prof. Christoph Renner und Prof. Michael Pfreundschuh, onkologisches Labor der Universität des Saarlandes.

Seit Februar 2006: Fortführung der Promotion bei Prof. Christoph Renner und Prof. Alexander Knuth, onkologisches Labor der Universität Zürich.

Homburg, im März 2010

„Not everything that can be counted counts and not everything that
counts can be counted“

Albert Einstein
(1879 – 1955)